

Université de Montréal

Étude moléculaire de la **ré**gulation du canal calcique ECaC-TRPV5 :
rôle de la phosphorylation et des interactions protéines-protéines

Par

Özlem Topalak

Département des sciences biomédicales

Faculté de Médecine

11600965

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures en vue de l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M. Sc.) en sciences biomédicales

Août 2004



©Özlem Topalak

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude moléculaire de la régulation du canal calcique ECaC-TRPV5 :
rôle de la phosphorylation et des interactions protéines-protéines

présenté par :

Özlem Topalak

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Rémy Sauvé
Président-rapporteur

Lucie Parent
directrice de recherche

Jean-Yves Lapointe
membre de jury

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES.....	III
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VII
REMERCIEMENTS	XII
RÉSUMÉ	XIII
ABSTRACT.....	XV
I. INTRODUCTION.....	1
1.1 L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE	1
1.1.1 <i>Le rein (le néphron : unité structurale du rein)</i>	3
1.1.2 <i>La réabsorption du calcium dans le néphron</i>	7
1.1.3 <i>Réabsorption paracellulaire</i>	8
1.1.4 <i>Réabsorption Transcellulaire</i>	8
1.1.5 <i>La Parathormone</i>	10
1.1.6 <i>La vitamine D</i>	14
1.1.7 <i>La calcitonine</i>	15
1.2 ECAC	16
1.2.1 <i>Structure Moléculaire d'ECaC</i>	17
1.2.2 <i>La famille TRP</i>	18
1.3 ÉTUDES MOLÉCULAIRES AU NIVEAU DU PORE.....	23
1.3.1 <i>Les sites moléculaires responsables de la perméabilité calcique de ECaC</i>	23
1.3.2 <i>La structure secondaire du pore de ECaC est similaire au canal KcsA : études de SCAM (Substituted Cysteine Accessibility Method)</i>	24
1.4 SITES POTENTIELS DE RÉGULATION DE ECAC.....	25
1.4.1 <i>Le rôle de la phosphorylation</i>	26
1.4.2 <i>Les répétitions d'ankyrine</i>	28
1.5 LA TECHNIQUE DOUBLE-HYBRIDE CHEZ LA LEVURE	30
1.6 HYPOTHÈSE DE TRAVAIL	33
II. MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	34
II.1 EXPRESSION ET CARACTÉRISATION FONCTIONNELLE DE ECAC-TRPV5 SAUVAGE ET DES MUTANTS.....	34
II.1.1 <i>Sous-clonage de ECaC-TRPV5</i>	34
II.1.2 <i>Mutagenèse dirigée par PCR («polymerase chain reaction»)</i>	35
II.1.3 <i>Transcription in vitro</i>	36
II.1.4 <i>Traduction in vitro</i>	36
II.1.5 <i>Injection dans les ovocytes de Xénope</i>	36
II.1.6 <i>Enregistrements électrophysiologiques en voltage imposé</i>	37
II.1.7 <i>Culture cellulaire et transfections</i>	37

II.1.8 Préparation membranaire des ovocytes	38
II.1.9 Lysat membranaire des cellules HEK-293.....	38
II.1.10 Dosage des protéines	39
II.1.11 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide.....	39
II.1.12 Traitement de la membrane de nitrocellulose et Immunodétection.....	40
II.2 INTERACTION PROTÉINE-PROTÉINE : TECHNIQUE DU DOUBLE HYBRIDE DANS LA LEVURE.....	40
II.2.1 Construction de l'appât	40
II.2.2 Transformation dans les levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
II.2.3 Criblage de la librairie d'ADNc prétransformée par la méthode de fusion de levures.....	42
II.2.4 Extraction des plasmides de la levure.....	44
II.2.5 Transformation par électroporation	44
II.2.6 Lysat cellulaire des levures.....	45
III. RÉSULTATS	46
III.1 RÔLE DE LA PHOSPHORYLATION	46
III.1.1 PKC : Mutations simples	48
III.1.2 PKA.....	50
III.1.3 PKC : Mutations multiples	51
III.1.4 L'effet des mutations multiples sur la désensibilisation.....	54
III.2 LES RÉPÉTITIONS D'ANKYRINE	57
III.2.1 Délétion des répétitions d'ankyrine, études électrophysiologiques	57
III.2.2 Délétion des répétitions d'ankyrine, études d'immunobuvardage	60
III.2.3 Études des interactions protéine-protéine par le système double-hybride	62
III.2.4 Rôle des répétitions d'ankyrine dans la tétramérisation du canal calcique ECAC-TRPV5	67
IV DISCUSSION	70
IV.1 LA DÉSENSIBILISATION DE ECAC-TRPV5 INDUIT PAR LE CALCIUM IMPLIQUE LES SITES CONSENSUS DE PHOSPHORYLATION PAR LA PKC.	70
IV.2 LA DÉLÉTION DES RÉPÉTITIONS D'ANKYRINE EMPÊCHE L'EXPRESSION FONCTIONNELLE DE ECAC-TRPV5	76
IV.3 LES RÉPÉTITIONS D'ANKYRINE SONT ESSENTIELLES POUR LA TÉTRAMÉRISATION DE ECAC-TRPV5	77
IV.4 PROTÉINES QUI INTERAGISSENT AVEC LE CANAL ECAC-TRPV5.....	82
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	84
VI. BIBLIOGRAPHIE	86
VII.ANNEXE	93

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I: LES PROPRIÉTÉS BIOPHYSIQUES DU CANAL ECAC-TRPV5 SAUVAGE ET MUTÉ EN ALANINE (MUTATIONS SIMPLES ET MULTIPLES) DANS LES OVOCYTES DE <i>XENOPUS</i>.	53
TABLEAU II: LES PROPRIÉTÉS BIOPHYSIQUES DU CANAL ECAC-TRPV5 SAUVAGE ET MUTANTS ΔANK DANS LES OVOCYTES DE <i>XENOPUS</i>.	59
TABLEAU III : ACTIVATION INDÉPENDANTE DE LA TRANSCRIPTION.....	64
TABLEAU IV : CLONES ORPHELINS INTERAGISSANT AVEC LES RÉPÉTITIONS D'ANKYRINE	64
TABLEAU V: CLONES CONNUS INTERAGISSANT AVEC LES RÉPÉTITIONS D'ANKYRINES.....	66

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : STRUCTURE DU NÉPHRON	5
FIGURE 2 : RÉABSORPTION RÉNALE DU CALCIUM	7
FIGURE 3 : TRANSPORT TRANSCELLULAIRE DE CALCIUM	9
FIGURE 4: REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE PROPOSÉE POUR ECAC	18
FIGURE 5 : ARBRE PHYLOGÉNIQUE DE LA FAMILLE DES TRP	19
FIGURE 6 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DES CANAUX TRP.....	20
FIGURE 7 : CASCADE DE SIGNALISATION DES CANAUX TRP	21
FIGURE 8 : REPRÉSENTATION DE LA STRUCTURE DU CANAL CALCIQUE ECAC-TRPV5 AVEC LES SITES POTENTIELS DE RÉGULATION	26
FIGURE 9 : MODÈLE STRUCTURAL DES RÉPÉTITIONS D'ANKYRINE DE ECAC-TRPV5 OBTENU PAR HOMOLOGIE.....	30
FIGURE 10 : LE PRINCIPE DU SYSTÈME DU DOUBLE HYBRIDE.....	32
FIGURE 11: REPRÉSENTATION DES PLASMIDES UTILISÉS POUR LE SOUS-CLONAGE DE ECAC	34
FIGURE 12 : LES MUTATIONS SIMPLES DES SITES CONSENSUS DE PHOSPHORYLATION PAR LA PKC NE MODIFIENT PAS LES PROPRIÉTÉS BIOPHYSIQUES DU CANAL ECAC- TRPV5	49
FIGURE 13 : LES MUTATIONS SIMPLES DES SITES CONSENSUS DE PHOSPHORYLATION PAR LA PKA NE MODIFIENT PAS LES PROPRIÉTÉS BIOPHYSIQUES DU CANAL ECAC- TRPV5	50
FIGURE 14 : LES MUTATIONS MULTIPLES DES SITES CONSENSUS DE PHOSPHORYLATION PAR LA PKC NE MODIFIENT PAS LES PROPRIÉTÉS BIOPHYSIQUES DU CANAL ECAC- TRPV5	52
FIGURE 15 : LES MUTATIONS MULTIPLES DES SITES CONSENSUS DE PHOSPHORYLATION PAR LA PKC DIMINUENT LE TEMPS REQUIS POUR LA DÉSENSIBILISATION DU CANAL	56
FIGURE 16 : LA REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES CONSTRUCTIONS DES DÉLÉTIONS DES RÉPÉTITIONS D'ANKYRINE.....	58
FIGURE 17 : LES DÉLÉTIONS DE RÉPÉTITIONS D'ANKYRINE PRODUISENT DES CANAUX NON-FONCTIONNELS.	58
FIGURE 18 : TRADUCTION <i>IN VITRO</i> DE ECAC-ΔANK	60
FIGURE 19 : L'EXPRESSION MEMBRANAIRE DE LA PROTÉINE ECAC-TRPV5 DIMINUE EN FONCTION DU NOMBRE DE RÉPÉTITIONS D'ANKYRINE QUI SONT DÉLÉTÉS.....	61
FIGURE 20 : CONFIRMATION DES INTERACTIONS OBTENUES PAR LE SYSTÈME DOUBLE- HYBRIDE	67
FIGURE 21 : LES RÉPÉTITIONS D'ANKYRINE INTERAGISSENT ENTRE ELLES.....	68

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Ω : ohm

μM : micromolaire

$^{\circ}\text{C}$: degré Celsius

$1\alpha\text{-HYD}$: 25-hydroxyvitamine D_3 -1 α -hydroxylase

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$: vitamine D_3

A : acide aminé alanine

AC : adénylate cyclase

ADN : acide déoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AMP : adénosine monophosphate

AMPC : AMP cyclique

Ank : ankyrine

ARN : acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

ATP : adénosine triphosphate

BCA : bicinchronic acid

BSA : bovine serum albumine

C- : carboxy

Ca^{2+} : calcium

CaBP : calcium binding protein

CaT : calcium transporter

Ca_v : canal calcique voltage dépendant

CFTR : "cystic fibrosis transmembrane conductance regulator"

cfu : "colony-forming-unit"

CGRP : "calcitonin gene related peptide"

Cl^- : chlore (ion chlorure)

DAG : sn-1,2-diacylglycérol

DBD : "vitamin D-binding protein"

DMEM : "Dulbecco modified eagle medium high glucose"

DO : densité optique

ECaC : "epithelial calcium channel"

ENAC : "epithelial sodium channel"

G : gravité

g : gramme

GDP : guanosine diphosphate

GTP : guanosine triphosphate

H₂O : eau

HEK-293 : "human embryonic kidney cells"

His : acide aminé histidine

HRP : "horseradish peroxidase"

I : courant

IC₅₀: concentration de cations divalents qui correspond à 50% de l'inhibition des courants Li⁺

IP₃ : inositol-1,4,5-triphosphate

kb : paires de kilobases

kDa : kiloDalton

kHz : kiloHertz

kV : kilovolt

Leu : acide amine leucine

Li⁺ : lithium (ions lithium)

M : molaire

mA : milliampère

Min : minutes

ml : millilitre

MTS : "Methanethiosulfonate"

MTSEA : "2-aminoethyl methanethiosulfonate hydrobromide"

MTSES : "sodium (2-sulfonatoethyl) methanethiosulfonate"

MTSET : "[2-(trimethylammonium)ethyl] methanethiosulfonate bromide"

mV : millivolt

n : nombre d'échantillonnage

N- : amino

Na^+ : sodium (ions sodiques)
 Na_v : canal sodique voltage dépendant
NCX : échangeur sodium/calcium
ng : nanogramme
NHE : échangeur Na/H
nl : nanolitre
nm : nanomètre
ODF : "osteoclast differentiation factor"
PCR : "polymerase chain reaction"
PEG : "polyethylene glycol"
 P_i : phosphate
 PIP_2 : phosphatidylinositol 4,5-biphosphate
PLC : phospholipase C
PMCA : pompe calcium-ATPase
PS : phosphatidylsérine
PTH : hormone parathyroïdienne
rpm : rotation par minute
rcf: relative centrifugal field
S : acide aminé serine
s : seconde
SCAM : "substituted cystein accessibility method"
SDS : sodium dodésulfate
T : acide aminé thréonine
Taq : *Thermus aquaticus*
TM : transmembranaire
Trp : acide aminé tryptophane
TRP : "transient receptor potential"
TRPC: protéine TRP de type "canonical"
TRPM: protéine TRP de type "melastin"
TRPV: protéine TRP de type "vannilloïd"
V : voltage

VDR: "vitamin D receptor"

VR : "vanilloid receptor"

X-gal : "5-bromo-4-choloro-3-indol- β -D-galactopyranosidase"

à mon père et à ma mère,

REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier le Dr Lucie Parent de m'avoir accueillie dans son laboratoire. La qualité de son encadrement, ses conseils précieux, sa grande disponibilité et sa patience m'ont soutenue tout au long de ma maîtrise.

Je voudrais aussi remercier les membres du laboratoire, Laurent, Eylem, Yolaine, Omar et Alexandra. J'ai beaucoup apprécié les conseils pratiques de Dr Hélène Klein et Dr Pierre Bissonette. Je remercie également Julie Verner, Michel Brunette et Louise Lefort pour toute leur aide.

Je remercie aussi tous les membres du Géprom qui m'ont soutenue. Ils sont responsables de l'environnement amical et accueillant qui a marqué la durée de mes études à la maîtrise. Un clin d'œil tout spécial à Zeinab Daher pour son amitié, sa présence et surtout sa qualité de cœur.

Je tiens également à remercier le Dr Guylain Boulay (pharmacologie, UdeS) et Marc Lussier pour les protocoles du double hybride, Dr Muriel Aubry (biochimie, UdeM) pour ses conseils, Dr Pierre Belhumeur (Microbiologie, UdeM) et Dr Christiane Malo pour nous avoir donné accès à son laboratoire pour la culture de levures.

Merci à ma famille; mes parents Ali et Kadriye, ma sœur Nejla, mes frères Hamit et Bekir et mon mari Mustafa, pour leur amour inconditionnel et leur soutien. Ils m'ont toujours encouragée afin que je puisse persévérer dans mes études et concrétiser mes espoirs. Un million de mercis ne suffit pas...

Finalement, je remercie le Dr Rémy Sauvé et le Dr Jean-Yves Lapointe pour avoir accepté d'évaluer mon mémoire.

RÉSUMÉ

Le canal calcique ECaC-TRPV5 est constitutivement actif lorsqu'il est exprimé dans les ovocytes de *Xenopus*. Les mécanismes moléculaires responsables de l'activation du canal ECaC-TRPV5 ne sont pas encore connus même si des résultats récents rapportent que le canal TRPV6, un canal apparenté à ECaC-TRPV5, est activé par la vidange des réservoirs intracellulaires et modulé par la calmoduline. Nous avons proposé que le canal ECaC-TRPV5 est constitutivement phosphorylé par la PKA ou la PKC dans les systèmes hétérologues et que l'influx calcique déclenche l'activation des phosphatases endogènes. Des sites consensus de phosphorylation par la PKC (S144, S298, S654, S664, S698) et la PKA (S669, T709) ont été mutés en alanine et exprimés dans les ovocytes de *Xenopus* afin tester la désensibilisation induite par le calcium. Les résultats préliminaires indiquent que la phosphorylation par la PKC peut être impliquée dans le processus de désensibilisation.

Par analogie avec les canaux ioniques à six segments transmembranaires, ECaC-TRPV5 est probablement un canal calcique qui est fonctionnel sous forme tétramérique. Nous avons proposé que les quatre répétitions d'ankyrine situées dans la partie N-terminale du canal ECaC-TRPV5 sont nécessaires pour l'assemblage fonctionnel des sous-unités. Les expériences effectuées en immunobuvardage démontrent que la délétion des répétitions d'ankyrine diminue l'expression membranaire du canal et que cette diminution est proportionnelle au nombre de répétitions d'ankyrine délétées. Nos résultats montrent toutefois que la délétion d'une seule répétition d'ankyrine est suffisante pour inhiber l'expression fonctionnelle du canal. Finalement, nous avons démontré avec le système double hybride dans la levure, que les répétitions d'ankyrine du canal ECaC interagissent ensemble, ce qui suggère qu'elles jouent un rôle dans l'homotétramérisation.

Mots Clés : TRPV5; phosphorylation; PKA; PKC ; répétition d'ankyrine;
homotétramérisation

ABSTRACT

ECaC-TRPV5 is a constitutively open channel when expressed in *Xenopus* oocytes. The signaling mechanisms that control the activation of ECaC-TRPV5 remains largely debated despite early reports that the related TRPV6 channel is activated by store-depletion and could be modulated by calmodulin. We postulated that ECaC-TRPV5 is constitutively phosphorylated by either PKA or PKC in heterologous expression systems and that Ca^{2+} influx triggers the activation of endogenous phosphatases. Consensus sites for PKA (S669 and T709) and PKC phosphorylation (S144, S298, S654, S664, S698) have been mutated to Ala ("inactivated" mutant) in single and multiple mutations. Mutant ECaC-TRPV5 channels have been functionally expressed in *Xenopus* oocytes, tested for constitutive activation and Ca^{2+} -induced desensitization. Preliminary data indicate that the PKC phosphorylation could be involved in Ca-induced desensitization.

By analogy with 6TM channels, ECaC-TRPV5 is likely to form functional homotetramers. We postulate that the four ankyrin repeats in the N-terminal region of ECaC-TRPV5 are necessary for functional subunit assembly. Deletion of the ankyrin repeats decreased the membrane expression of the channel as assessed by Western blotting using the anti-c-myc antibody. The membrane expression of ECaC-TRPV5 decreased with the number of ankyrin repeats being deleted. Despite still being present at the membrane, deletion of a single ankyrin repeat was sufficient to inhibit functional channel expression. Using the yeast two hybrid assay, we have shown that the ankyrin repeats interact with each other suggesting that they could be involved in homotetramerisation.

Key words: TRPV5; phosphorylation; PKA; PKC; ankyrin repeats; homotetramerisation

I. INTRODUCTION

I.1 L'homéostasie calcique

La majeure partie du calcium (99%) dans le corps réside dans les os et les dents sous forme insoluble, tandis que seulement 1% se retrouve sous forme libre dans le milieu intra- ou extracellulaire. Le calcium dans les os et les dents est majoritairement sous forme de sels de phosphate de calcium (hydroxyapatite, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), alors que dans le plasma, 50% du calcium est lié à des protéines circulantes et 50% du calcium existe sous sa forme ionisée. La concentration plasmatique de calcium libre est maintenue constante à 1.24mM.[1] La concentration intracellulaire de calcium ionisé est de 0.1 μ M.[2] Il y a donc environ 10 000 fois plus de Ca^{2+} à l'extérieur de la cellule que dans le cytosol.

Le maintien de ce gradient est vital pour la survie de la cellule car le Ca^{2+} est un messager second ubiquitaire qui joue un rôle important dans de nombreux processus physiologiques. En effet, il est impliqué dans le développement et le contrôle de nombreuses fonctions cellulaires telles que le couplage excitation-contraction dans le muscle, la libération d'hormones et de neurotransmetteurs, l'activation d'enzymes et l'expression de certains gènes.

Le maintien de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} est réalisé par de nombreux transporteurs de calcium, dont la pompe Ca^{2+} -ATPase et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Les Ca^{2+} -ATPases sont des pompes transportant le Ca^{2+} hors du cytoplasme d'une façon active en consommant donc l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP. L'activité de la pompe calcique est stimulée par le complexe Ca^{2+} -calmoduline.

L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ consiste en un système de transport bidirectionnel secondaire actif, ne consommant pas directement de l'ATP. Dans les conditions physiologiques normales, le Ca^{2+} sort de la cellule grâce au Na^+ qui y entre en suivant son gradient électrochimique.[3]

Une diminution du taux de calcium ionisé circulant (hypocalcémie) provoque souvent des crampes (tétanie), un travail cardiaque systolique moindre, une fonction réduite du ventricule gauche et une hypocalcémie prolongée qui peut provoquer une déminéralisation (ostéoporose) pouvant entraîner des fractures spontanées. Une augmentation de calcium ionisé (hypercalcémie) peut provoquer le coma.

Deux systèmes contrôlent l'homéostasie calcique. Tout d'abord, le système endocrinien surveille la concentration de calcium et sécrète des hormones calciotropiques suite à une modification de la calcémie : les cellules de la parathyroïde sécrètent la PTH (l'hormone parathyroïdienne), les cellules C de la thyroïde sécrètent la calcitonine et les cellules rénales produisent la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Le second système est composé des tissus et des organes effecteurs, tels que les os, les reins et l'intestin sur lesquels agissent ces hormones. Ces tissus et organes modifient leur transport de calcium.

Chez l'homme, la consommation quotidienne de calcium varie entre 300 et 1500 mg alors que la dose recommandée se situe à 800 mg/jour. Environ 30% du calcium est absorbé dans l'intestin, cette absorption est influencée par de nombreux facteurs, tels que l'âge, les niveaux de vitamine D, la lactation, la gestation ainsi que par la présence d'autres nutriments.[4]

L'absorption du calcium s'effectue tout au long du duodénum et dans le cécum de façon transcellulaire ou paracellulaire. L'absorption transcellulaire du calcium comporte les étapes suivantes : le calcium diffusé

passivement dans la cellule est acheminé à travers le cytoplasme vers la membrane basolatérale où il est expulsé par transport actif à travers la pompe PMCA1b et par l'échangeur NCX1. Lors de l'absorption paracellulaire, le calcium ne pénètre pas dans la cellule, mais traverse entre les jonctions cellulaires grâce à un gradient de concentration de calcium.[5]

La majeure partie du calcium consommé n'est pas absorbée par l'intestin, mais est directement excrétée par la voie fécale. Cette voie d'excrétion du calcium est importante, mais n'est pas impliquée directement dans le contrôle de la calcémie à court terme. Par contre, l'excrétion urinaire du calcium peut varier et elle constitue une voie importante dans le maintien de l'homéostasie calcique.

1.1.1 Le rein (le néphron : unité structurale du rein)

Les reins débarrassent le sang des déchets azotés et participent à l'osmorégulation en réglant les concentrations sanguines de divers électrolytes. Chez l'humain, les reins sont des organes pairs, ayant chacun la forme d'un haricot, d'une longueur d'environ 10 cm. Le sang pénètre dans chaque rein par l'artère rénale et le quitte par la veine rénale. Le rein humain contient environ un million de néphrons (à peu près 80 km de tubules), qui constitue l'unité structurale et fonctionnelle du rein. Le néphron est formé d'un corpuscule rénal et d'un tubule rénal entouré de vaisseaux sanguins. L'eau, l'urée, les électrolytes et les autres petites molécules présentes dans le sang sortent des capillaires du corpuscule rénal et entrent dans le tubule rénal, où le liquide s'appelle le filtrat.

L'extrémité du néphron qui reçoit le filtrat du sang, est nommé glomérule rénal (ou capsule de Bowman). Cette capsule renferme un bouquet de capillaires, le glomérule. La capsule glomérulaire rénale et le glomérule forment le corpuscule rénal. A partir de la capsule glomérulaire, le filtrat passe successivement par trois régions principales du tubule rénal : le

tubule contourné proximal, l'anse de Henlé (une longue boucle aplatie formée d'une partie descendante et d'une partie ascendante) et le tubule contourné distal. Cette dernière portion du tubule rénal déverse son filtrat dans le tubule rénal collecteur, qui reçoit le filtrat de nombreux autres tubules rénaux.

Les capsules glomérulaires rénales, les tubules contournés proximaux et les tubules contournés distaux se trouvent dans la zone externe du rein, le cortex. Environ 80% des néphrons sont corticaux et ceux-ci sont caractérisés par des anses de Henlé raccourcies qui sont presque entièrement confinées au cortex. Les 20% restants sont des néphrons juxtamédullaires qui possèdent des anses bien développées qui pénètrent dans la zone interne du rein, la médulla.

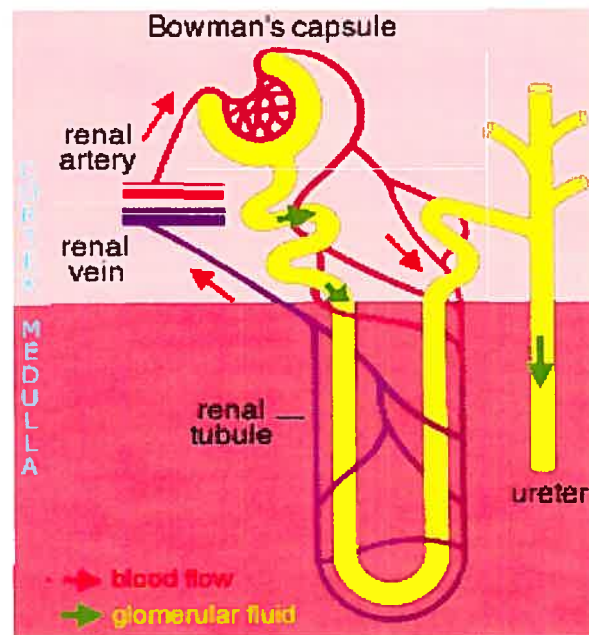


Figure 1 : Structure du néphron

Le néphron consiste en un corpuscule rénal et un tubule rénal entouré de vaisseaux sanguins. En raison de la pression artérielle, l'eau et tous les petits solutés du plasma sanguin des capillaires de capsules glomérulaires se trouvent forcés de traverser la paroi de la capsule (*Bowman's capsule*) puis d'entrer dans la lumière du tubule rénal. Les flèches en vert indiquent la direction du flux glomérulaire (*glomerular fluid*) dans le tubule rénal là où la majorité des électrolytes sont réabsorbés. Les flèches en rouge indiquent la direction du flux sanguin (*blood flow*). Adapté d'Ellison DH. et al. 2000.

Les néphrons équilibrent la composition du sang par la filtration, la sécrétion et la réabsorption. La filtration glomérulaire s'effectue de façon non sélective pour toutes les molécules dont la taille est inférieure à 3.5nm (l'albumine, ayant un diamètre de 3.6nm, ne passe donc pas dans l'urine). Alors il est important que les petites molécules essentielles à l'organisme

retournent au liquide interstitiel et au plasma sanguin. On appelle la réabsorption ce transport sélectif qui fait passer certaines substances du filtrat dans le liquide interstitiel à travers l'épithélium du tubule rénal. Les tubules contournés et l'anse de Henlé contribuent tous à la réabsorption, ainsi que le tubule rénal collecteur qui reçoit le filtrat du tubule contourné distal. Presque tous les glucides, vitamines et autres nutriments organiques sont réabsorbés. Ce processus de réabsorption équilibre les concentrations sanguines de divers électrolytes, tel que le calcium, réagissant ainsi aux déséquilibres en amenant les reins à excréter une plus ou moins grande quantité d'un type d'ion en particulier.[6]

1.2.2 La réabsorption du calcium dans le néphron

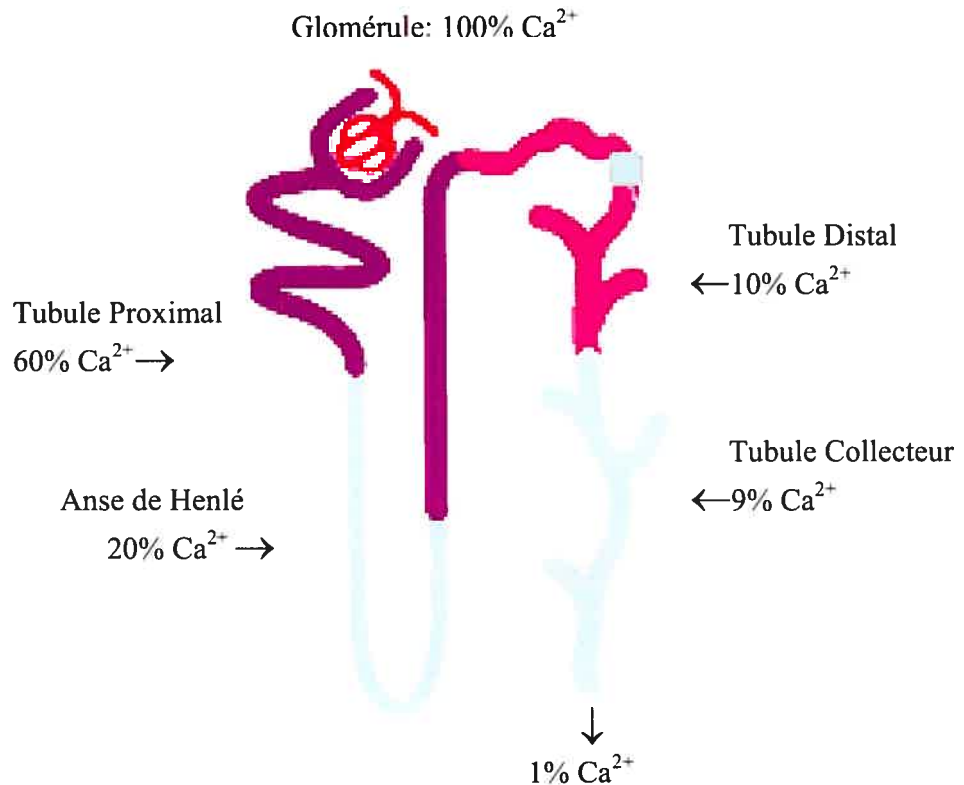


Figure 2 : Réabsorption rénale du calcium

60% du calcium filtré est réabsorbé de façon paracellulaire par les tubules proximaux. 20% est réabsorbé de façon paracellulaire par le tubule ascendant large. 10% est réabsorbé par les tubules distaux et 9% est réabsorbé dans les tubules collecteurs de façon principalement transcellulaire. Adapté d'Ellison DH. et al. 2000.

Les reins jouent un rôle majeur de régulation à court terme dans le maintien de la calcémie ionisée alors que l'intestin et les os assurent l'homéostasie à moyen et long termes. Dans des conditions normales, environ 8g de Ca^{2+} est filtré dans les glomérules chaque jour dont la majorité (99%) est réabsorbée tout le long du néphron car seulement 1% est éliminé par la voie urinaire. La réabsorption d'une plus grande quantité de calcium (environ 60%) s'effectue d'une façon passive dans le tubule proximal selon la

voie paracellulaire.[7] Une fraction moins importante du calcium, soit 20%, est réabsorbée dans l'anse de Henlé. Ce phénomène implique à la fois des voies transcellulaire et paracellulaire.[6, 8] Le tubule contourné distal et la partie corticale du tubule collecteur sont responsables de 20% de la réabsorption du calcium filtré. Dans ce cas, les mécanismes du transport de calcium sont transcellulaires. C'est à ce niveau que les hormones (la PTH, la vitamine D₃ et la calcitonine) exercent leurs effets, ce qui permet au tubule distal, un ajustement fin de la réabsorption tubulaire du calcium.[9]

I.1.3 Réabsorption paracellulaire

La réabsorption passive de calcium s'effectue par le passage du calcium via la voie paracellulaire sous l'effet du potentiel électrochimique transépithélial créée par la réabsorption du sodium et de l'eau qui est indirectement régulée par l'angiotensine II, la dopamine et le système α -adrénergique. Il existe donc un contrôle indirect du flux paracellulaire de calcium et ce contrôle touche l'ensemble des phénomènes de réabsorption et non seulement le transport du calcium.[10]

I.1.4 Réabsorption Transcellulaire

La réabsorption du calcium via la voie transcellulaire s'effectue indépendamment de la balance sodique. Ce processus se produit en 3 étapes : Dans un premier temps, le calcium entre de façon passive dans la cellule épithéliale via un canal calcique qui sera discuté en détail plus loin. Dans le cytoplasme, le calcium se lie à des protéines de la famille des calbindins (CaBP), ce qui facilite son transport vers la membrane basolatérale accélérant ainsi la diffusion du calcium à travers le cytosol. La protéine calbindin-D₂₈ est localisée principalement dans les reins. Des études ont démontré que cette protéine est sous le contrôle de la 1,25(OH)₂D₃, qui augmente la transcription du gène codant pour cette protéine.

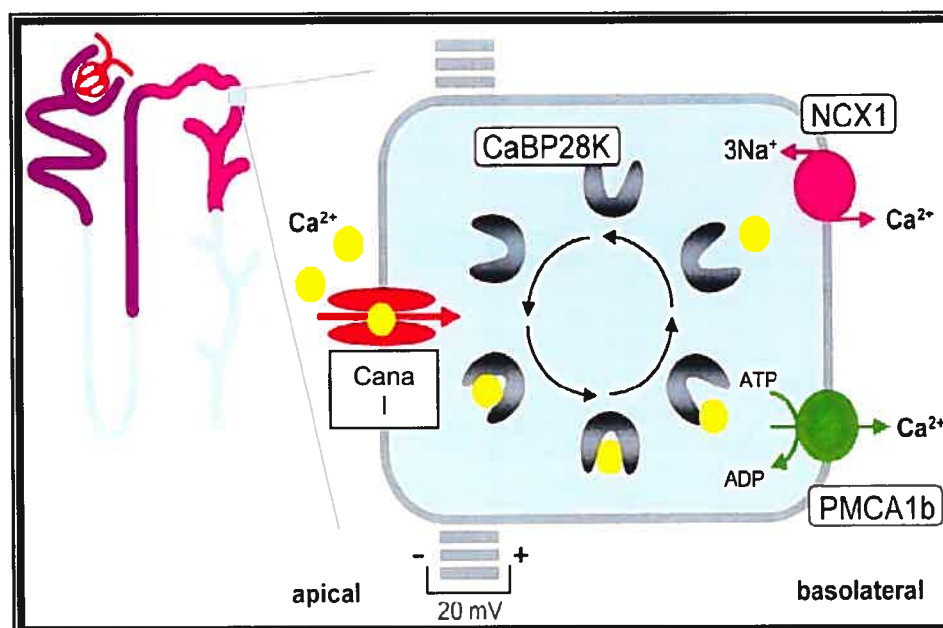


Figure 3 : Transport transcellulaire de calcium

Ce modèle proposé représente la réabsorption du calcium dans le tubule distal du rein via la voie transcellulaire. Le calcium de la lumière tubulaire entre dans la cellule par un canal calcique se trouvant à la membrane apicale. Une fois dans la cellule, ces ions Ca^{2+} sont pris en charge par des protéines de liaison, les CaBP, qui permettent le transport du calcium de la face apicale jusqu'à la face basolatérale. Au niveau de la membrane basolatérale, l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX1) et la pompe Ca^{2+} -ATPase (PMCA1b) permettent l'extrusion des ions Ca^{2+} vers la lumière les voies sanguines. Adapté de Hoenderop J. et al, 2000.

Finalement, à la membrane basolatérale, le calcium est expulsé hors de la cellule vers le plasma, ce qui contribue à augmenter la calcémie. Deux transporteurs sont responsables de cette expulsion : la pompe Ca^{2+} -ATPase (PMCA) et l'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX). L'échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ échange 3 ions sodium pour 1 ion calcium. Donc, suite à une augmentation de calcium de la concentration intracellulaire de calcium, cet échangeur transporte le calcium

vers l'extérieur de la cellule et contribue à la normalisation de la concentration intracellulaire de calcium. La Ca^{2+} -ATPase utilise l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP pour transporter le calcium contre son gradient de concentration. Il existe 4 gènes codant pour la PMCA. L'isoforme PMCA1b est principalement exprimé dans le rein et sa transcription est sous le contrôle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. [11-15]

I.1.5 La Parathormone

La glande parathyroïdienne produit et secrète la parathormone (PTH) en réponse à une diminution de la calcémie. La parathormone est un polypeptide composé d'une chaîne de 84 acides aminés. Chez l'homme, le gène code pour un peptide de 111 acides aminés, la Pré-Pro-PTH, rapidement clivée en un peptide de 90 acides aminés, la Pro-PTH, et, enfin, en PTH, qui est la molécule stockée et sécrétée. La PTH stockée n'est pas intégralement sécrétée : une fraction variable de l'hormone intacte fait l'objet d'un métabolisme intracytoplasmique.

La PTH circulante est un mélange d'hormone intacte et de fragments provenant de la protéolyse de la molécule entière. Cette protéolyse se produit dans les glandes parathyroïdiennes et les organes périphériques. La PTH circule essentiellement sous deux formes : l'hormone intacte biologiquement active et le fragment carboxy-terminal biologiquement inactif.

Une source importante de fragments circulants est constituée par le métabolisme de la PTH par certains organes périphériques : le foie, le rein, et l'os. Le rein joue un rôle essentiel dans le métabolisme de la PTH intacte et des fragments circulants. La capture péritubulaire de la molécule intacte permet son clivage en deux fragments, amino- et carboxy-terminal.

La concentration de calcium extracellulaire module directement la sécrétion de PTH et la synthèse d'ARNm de PréproPTH par les cellules

parathyroïdiennes. Ces cellules possèdent un récepteur pour calcium (récepteur CaSR, récemment cloné par EM Brown 2002[16]). Le calcium extracellulaire se lie au récepteur et inhibe la sécrétion de PTH.

En réponse à une hypocalcémie soutenue, l'augmentation de la sécrétion de PTH fait appel à la mobilisation des réserves intracellulaires d'hormones déjà synthétisées. Cependant, les réserves cellulaires ne permettent d'assurer une sécrétion maximale que pendant 60 à 90 min. La dégradation cellulaire de la PTH stockée varie en fonction de la calcémie.

Lorsqu'une hypocalcémie se prolonge au-delà de quelques heures, l'augmentation de la sécrétion de PTH ne peut plus résulter de la seule mobilisation des réserves hormonales existantes. En effet après plusieurs jours d'hypocalcémie permanente, le nombre de cellules parathyroïdiennes s'accroît, ce qui résulte en une prolifération cellulaire. [17]

Le récepteur (commun à la PTH et à son peptide apparenté, la PTHr) lie les extrémités amino-terminales de la PTH. Il appartient à la superfamille des récepteurs à sept segments transmembranaires liés à une protéine G. Le récepteur de la PTH stimule, par l'intermédiaire de différentes protéines G, plusieurs effecteurs, dont l'AC (adénylate cyclase) et la PLC (phospholipase C). Les analyses de type Northern Blot montrent qu'il est exprimé dans de nombreux tissus dont le foie et le rein, la peau et les zones de croissance des os longs, les couches de chondrocytes, les ostéoblastes et certaines cellules médullaires.

La parathormone joue un rôle essentiel dans le contrôle de la calcémie en agissant à trois niveaux afin de maintenir l'homéostasie calcique. Tout d'abord, elle augmente la réabsorption de calcium et l'excrétion de phosphate par le rein. Ensuite, la PTH stimule la synthèse de l'enzyme 25-hydroxyvitamine D₃-1 α -hydroxylase (1 α -HYD), cette enzyme

convertit la $25(\text{OH})\text{D}_3$ en son métabolite actif la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Finalement, la PTH agit directement sur le remodelage des os.

La PTH affecte le transport de sodium, de potassium, de bicarbonate, d'hydrogène, de calcium et de phosphate au niveau du rein. Toutefois, son effet sur l'absorption de calcium et sur l'excrétion de phosphate demeure le principal mode de contrôle de la calcémie. En effet, la PTH induit la réabsorption de calcium de deux manières. Premièrement, elle favorise la réabsorption paracellulaire du calcium. Ce processus dépend de l'activation du cotransporteur Na-K-2Cl. Ce cotransporteur génère un gradient électrochimique qui induit la diffusion paracellulaire du calcium. La PTH en se liant à son récepteur active l'adenylate cyclase (AC), ce qui génère de l'AMPc (adénosine 3',5'-monophosphate cyclique), qui active, par l'intermédiaire de la PKA, le cotransporteur. Deuxièmement la PTH favorise aussi la réabsorption transcellulaire du calcium en activant la PKA (protéine kinase A) et la PKC (protéine kinase C).[18-21]

Une diminution de la calcémie induit la résorption des os, ce qui libère du calcium et du phosphate. Par contre, une augmentation de la concentration de phosphate dans le sang est favorable à la formation des os à partir de calcium et de phosphate, ce qui a pour effet de diminuer la concentration de calcium extracellulaire. La résorption des os doit donc être obligatoirement associée à une diminution de la réabsorption de phosphate par le rein. Au niveau du rein, cette réabsorption s'effectue grâce au cotransporteur Na/Pi. Des études ont démontré que la PTH pouvait induire la dégradation de ce transporteur, ce qui a pour effet de diminuer la réabsorption du phosphate. [22]

La vitamine D est d'abord métabolisée dans le foie en $25-(\text{OH})$ -vitamine D_3 , puis dans le rein, en son métabolite actif le $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ par l'enzyme 1α -HYD. La synthèse de cette enzyme est sous le contrôle de la

PTH. En effet, il a été démontré que les animaux ayant subi une parathyroïdectomie ne peuvent plus synthétiser la forme active de la vitamine D ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$), par contre, l'administration de PTH à ces animaux induit la production de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. [23]

Le clonage du promoteur de la 1α -HYD et des études sur celui-ci ont révélé qu'il possédait un élément de réponse à la PTH (activation de la transcription) ainsi qu'un élément de réponse à la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (inhibition de la transcription). De plus, le promoteur de la 1α -HYD contient de nombreux sites de réponse à l'AMPc tels que des sites CRE («*cAMP-responsive element*»), AP-1, AP-2 et SP-1. Ces sites pourraient être responsables de la régulation par la PTH car, lorsque liée à son récepteur, la PTH induit la production d'AMPc. [24]

Le remodelage osseux est un processus continu qui consiste en la résorption des os, suivie de la synthèse d'une nouvelle matrice osseuse et finalement sa minéralisation (formation des os). Les ostéoclastes et les ostéoblastes font partie intégrale de ce processus continu. De plus, ces cellules jouent un rôle important dans l'homéostasie calcique en contrôlant la formation (diminution de la calcémie) et la résorption (augmentation de la calcémie) des os. Des études ont montré que la PTH active la résorption et inhibe la formation des os, ce qui a pour effet d'augmenter la calcémie. Les ostéoclastes dégradent les os en sécrétant de l'acide chlorhydrique ainsi que de nombreuses protéases qui dégradent le collagène de type I, un des composants essentiels de la matrice osseuse. [25] En effet, trois heures après l'administration de la PTH, une augmentation de l'activité métabolique des ostéoclastes peut être observée et 24 heures après ce traitement, le nombre d'ostéoclastes est augmenté, ce qui a pour effet de favoriser la résorption des os et donc d'augmenter la calcémie. [26]

La PTH affecte aussi l'activité des ostéoblastes, ces cellules responsables de la formation des os. En effet, après un traitement à la PTH, ces cellules changent de phénotype et de fonction : elles contrôlent maintenant la résorption des os.[27] La PTH inhibe la synthèse du collagène de type 1, stimule la synthèse de collagénase et stimule la production de nombreuses cytokines par les ostéoblastes.[28] De plus, la PTH stimule la production de ODF («*Osteoclast Differentiation Factor*») par les ostéoblastes. Ce facteur augmente le nombre d'ostéoclastes et donc augmente la résorption des os. [29]

Bref, la PTH sécrétée suite à une hypocalcémie, a plusieurs rôles importants. Cette hormone augmente la réabsorption du calcium et l'excrétion du phosphate au niveau du rein. Elle stimule la synthèse de l'enzyme 1α -HYD et augmente la résorption des os. Tous ces effets ont pour but de maintenir l'homéostasie calcique.

I.1.6 La vitamine D

La vitamine D (vitamine D₃), contrairement aux autres vitamines, peut être produite par l'organisme. Suite à une exposition aux rayons ultraviolets du soleil, le 7-déhydrocholestérol, qui se trouve dans la peau, est métabolisé en vitamine D. Cette vitamine est convertie en 25(OH)D₃ dans le foie par l'enzyme 25-HYD, puis est convertie en 1,25(OH)₂D₃ par l'enzyme 1α -HYD, une enzyme rénale sous le contrôle de la PTH. La 1,25(OH)₂D₃, le métabolite actif de la vitamine D, est une hormone stéroïdienne qui lie le récepteur à la vitamine D (VDR) dans le noyau de certaines cellules et ainsi peut contrôler la transcription de certains gènes. La vitamine D et ses produits hydroxylés sont des molécules lipophiliques, peu solubles dans le plasma. Elles circulent donc liées à des protéines DBP («*vitamin D-binding protein*»).[30]

La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ n'a un effet que sur les cellules exprimant son récepteur, le VDR. Ce récepteur est retrouvé dans les cellules des glandes parathyroïdiennes et comme l'injection de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ par la voie intraveineuse diminue la sécrétion de PTH, un effet de cette hormone sur la sécrétion de PTH a été suggéré.[30] Des études subséquentes ont démontré qu'en effet la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibait la prolifération des cellules de la parathyroïde en plus d'inhiber la sécrétion de PTH. [17, 31]

L'analyse du promoteur de la PTH révéla de nombreux éléments de liaison au VDR («*Vitamin D receptor*»), ce qui suggère que la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ inhibe l'expression du gène de la PTH.[32, 33] Le VDR est aussi retrouvé dans les reins. Des études ont démontré que la protéine calbindine- D_{28} est sous le contrôle de la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, qui augmente la transcription du gène codant pour cette protéine.[34, 35] La vitamine D contrôle aussi la régulation du gène codant pour le PMCA1b dans le rein. Elle inhibe le gène codant pour 1α -HYD. Des études de la région du promoteur de cette enzyme ont montré une régulation positive par la PTH et une inhibition par la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Il est intéressant de souligner que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ autorégule sa production en inhibant la sécrétion de la PTH et la synthèse de l'enzyme 1α -HYD.[24, 36]

I.1.7 La calcitonine

La calcitonine et CGRP («*calcitonin gene related peptide*») sont des hormones produites par épissage alternatif du transcrit du gène α -calcitonin/CGRG. La calcitonine est produite principalement par la thyroïde, alors que la CGRP peut être produite par toutes les cellules qui expriment le gène codant pour cette protéine. La calcitonine est une hormone de 32 acides aminés sécrétée par les cellules C de la thyroïde en réponse à une hypercalcémie. Cette hormone a des effets opposés à ceux de la PTH, c'est-à-dire qu'elle stimule l'excrétion du calcium urinaire et diminue la

réabsorption au niveau des os, ce qui a pour conséquence de diminuer la calcémie.

La réabsorption du sodium s'effectue par un mécanisme transcellulaire impliquant l'échangeur Na/H (NHE), le cotransporteur Na-K-2Cl (NKCC), et les canaux sodiques (ENaC). La calcitonine augmente l'excrétion urinaire de sodium en inhibant l'échangeur Na/H, la pompe Na-K-ATPase ainsi que le cotransporteur NKCC.[37, 38]

Etant donné que la réabsorption du calcium est intimement liée à la réabsorption du sodium (le principe de la réabsorption paracellulaire), une inhibition de la réabsorption du sodium diminue la réabsorption du calcium et ainsi augmente l'excrétion urinaire de calcium. De plus, la calcitonine inhibe l'activité des ostéoclastes probablement par une voie de signalisation impliquant l'AMPc.[38, 39]

Ces hormones calciotropiques permettent la réabsorption du calcium dans le tubule distal du rein.

I.2 ECaC

Jusqu'en 1999, la nature moléculaire de la protéine responsable de l'entrée du calcium dans le tubule distal n'était pas connue. En 1999, l'équipe de Bindels a cloné par expression, un canal calcique à partir des cellules du tubule distal du rein de lapin (Hoenderop 1999) qu'il a nommé ECaC («*epithelial calcium channel*»). Les résultats obtenus démontrent clairement que l'ARNm qui code pour ce canal est très abondant dans le tubule distal. Ce canal a par la suite été cloné par homologie dans notre laboratoire (voir Matériel et Méthodes). Le clonage d'ECaC a permis d'avoir de nouvelles opportunités afin d'étudier le processus de la réabsorption via la voie transcellulaire.

Il existe deux gènes de ECaC : ECaC1 et ECaC2 (ou CaT1) qui sont transcrits à partir des gènes distincts situés sur le chromosome 7q35. ECaC2 est plutôt exprimé dans le petit intestin tandis que ECaC1 est exprimé dans la partie apicale du tubule distal du rein. Il a été démontré que ECaC est aussi exprimé dans les testicules, la prostate, l'estomac, le placenta, le pancréas et le cerveau. ECaC1 et ECaC2 ont été clonés à partir de plusieurs espèces dont le lapin, le rat, le souris et l'humain. Leurs séquences primaires présentent environ 85% d'homologie dans la même espèce. [10, 34, 40]

1.2.1 Structure Moléculaire d'ECaC

L'ADN codant pour ECaC chez le lapin, contient 2190 nucléotides codant pour une protéine de 83 kDa. Des analyses d'hydrophobicité suggèrent une topologie de six segments transmembranaires (S1-S6) avec une région semi-transmembranaire (la boucle entre S5 et S6) rappelant la région du pore responsable du passage des ions. Par analogie avec les canaux potassiques, sodiques et calciques dépendants du potentiel membranaire qui sont composés de 4 domaines de six segments transmembranaires, ECaC fonctionne probablement comme un tétramère composé de quatre sous-unités séparés. Le N-terminal et le C-terminal du canal sont cytoplasmiques.[9]

La structure secondaire de ECaC avec les six domaines TM (transmembranaires) et les extrémités intracellulaires indique qu'il appartient à la famille des canaux de type TRP(*Transient Receptor Potential*).

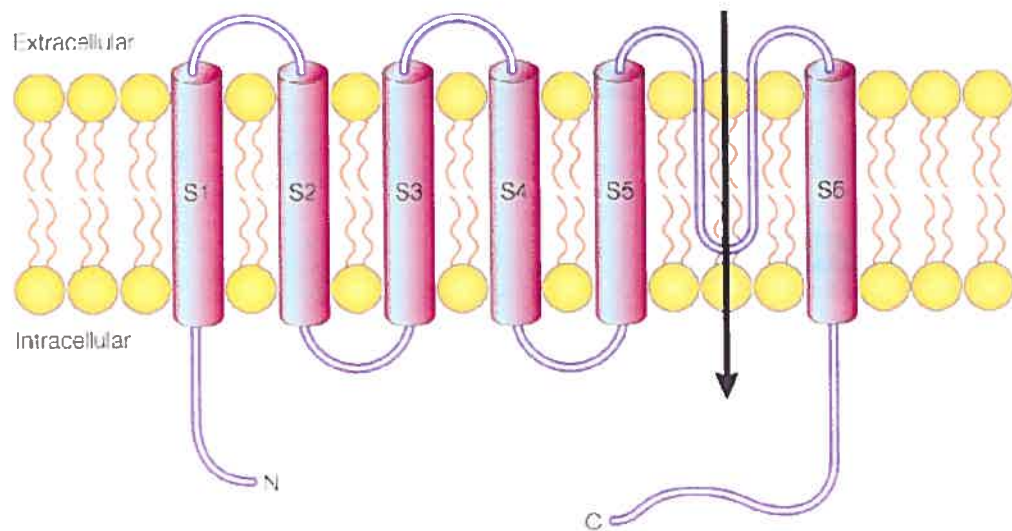


Figure 4: Représentation schématique de la structure secondaire proposée pour ECaC

Les cylindres représentent les segments transmembranaires (S1-S6). La région présumée du pore est située dans la boucle semi-transmembranaire entre S5 et S6. Le N-terminal et le C-terminal du canal sont cytoplasmique. Adapté de Hoenderop et al, 2000.

I.2.2 La famille TRP

Les canaux ioniques TRP chez les mammifères ont été nommé ainsi à cause du rôle des canaux impliqués dans la phototransduction (système visuel) chez la *Drosophila melanogaster*. Environ 21 gènes différents codent pour les sous-unités de ces canaux ioniques. Il existe quatre sous-familles des canaux TRP : TRPC (*canonical*), TRPV (*vanilloid*), TRPM (*melastin*) et TRPP (*PKD*).[41]

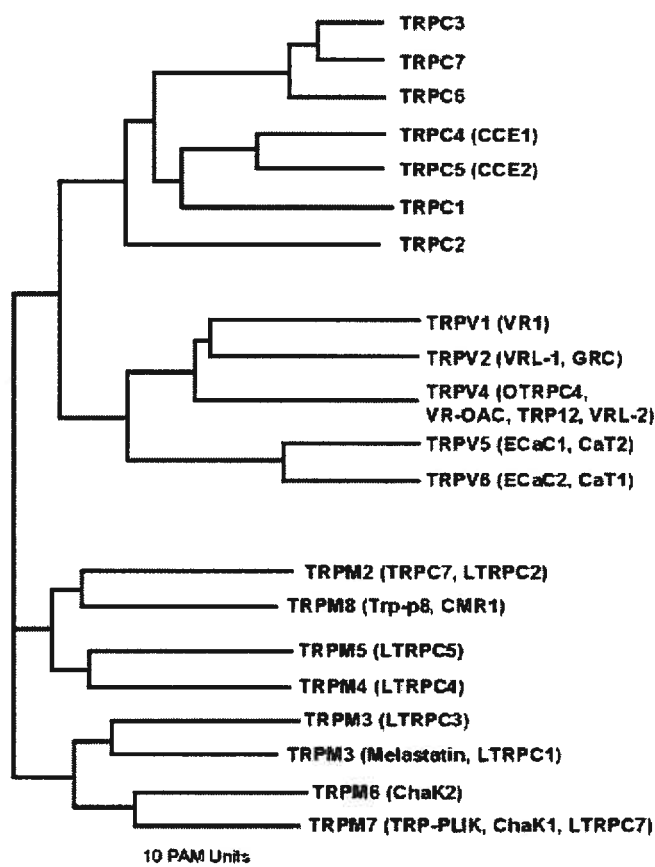


Figure 5 : Arbre phylogénique de la famille des TRP

Arbre phylogénique représentant les distances évolutives entre les différentes protéines regroupées à l'intérieur de la super famille des TRP. Seulement trois sous-familles (TRPV, TRPC et TRPM) sont présentées. Tiré de Montell C. et al, 2002.

Comme nous l'avons déjà indiqué, la structure secondaire commune à tous les canaux de type TRP est composée de six domaines TM, la région présumé du pore entre le S5 et le S6 et les extrémités intracellulaires. Un domaine TRP composé de 25 acides aminés contenant la boîte TRP (EWKFAR) est présente dans tous les canaux TRPC mais pas tous les canaux TRPV ou TRPM. Le domaine amino-terminal des canaux TRPC et TRPV contient des répétitions d'ankyrine. Il y a la présence d'une région

riche en proline dans le domaine carboxy-terminal des canaux TRPC et TRPM. [42-45]

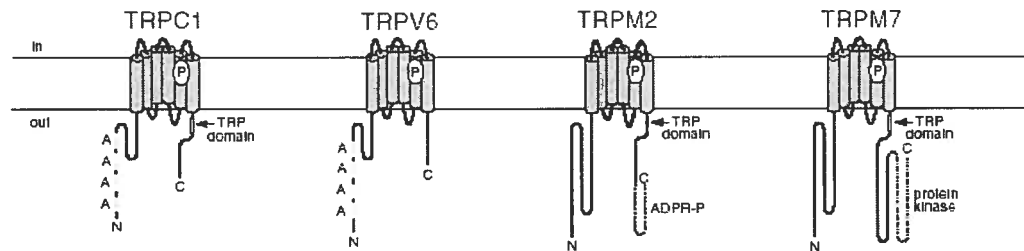


Figure 6 : Représentation schématique de la structure secondaire des canaux TRP

Les canaux de la famille TRP sont formés de six segments transmembranaires avec la région présumée du pore se trouvant entre les segments S5 et S6 et un domaine TRP (sauf les TRPV) dans leur queue carboxy-terminal. Les sous-familles TRPC et TRPV possèdent dans le N-terminal des répétitions d'ankyrine. Tiré de Clapham et al, 2002.

Contrairement aux canaux voltage dépendant (ex : familles Ca_v et Na_v), les canaux TRP ne sont pas activés par la dépolarisation de la membrane. Très souvent, l'activité de ces canaux est induite par la liaison d'un agoniste à son récepteur. Cette liaison peut induire directement l'ouverture de canaux ou indirectement, en induisant d'abord une voie de signalisation qui à son tour induit l'ouverture des canaux.

Plusieurs voies d'activation des canaux TRP ont été proposées, (Figure 7) parmi lesquelles les récepteurs couplés aux protéines G et les récepteurs à activité tyrosine kinase.

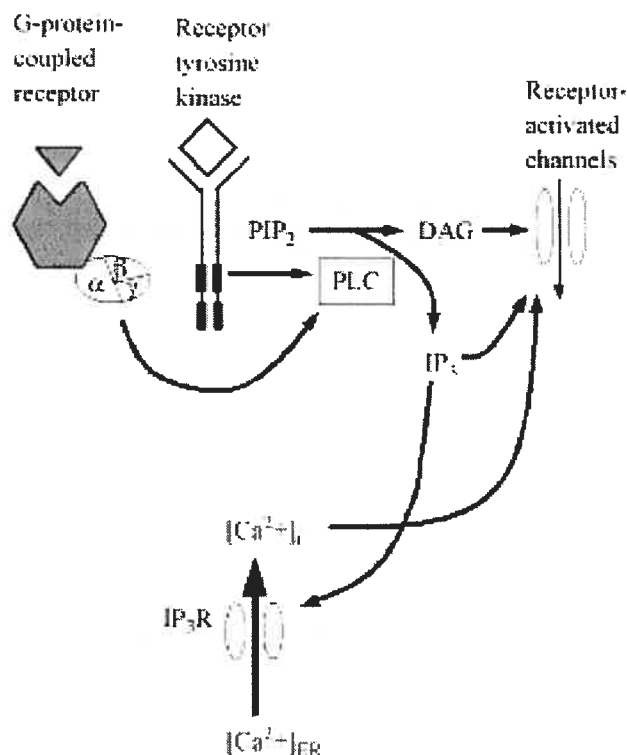


Figure 7 : Cascade de signalisation des canaux TRP

Les canaux de type TRP peuvent être activés par les récepteurs couplés aux protéines G ou par les récepteurs à activité tyrosine kinase. La stimulation de ces récepteurs conduit via différents messagers seconds à l'activation des canaux TRP. Adapté de Vennekens et al, 2002.

La liaison d'un agoniste sur le récepteur à activité tyrosine kinase induit une dimérisation et une autophosphorylation des récepteurs, ce qui amène son activation. Une fois activés, les récepteurs tyrosine kinase servent de point d'ancrage à certaines protéines effectrices, comme la PLC. D'un autre côté la liaison d'un agoniste sur un récepteur couplé à une protéine G, active cette protéine en provoquant l'échange d'un GDP (guanosine 5'-diphosphate) pour une GTP (guanosine 5' triphosphate) sur la sous-unité α . Suite à cet échange, la sous-unité α se dissocie de la sous-unité $\beta\gamma$. Chacune des sous-unités agit spécifiquement sur des protéines

effectrices. Ainsi, un récepteur couplé à une protéine G_s active l'AC et permet ainsi l'augmentation d'AMPc. Tandis qu'un récepteur couplé à une protéine de la famille G_q active la PLC. La PLC hydrolyse le PIP_2 (phosphatidylinositol 4,5-biphosphate) en IP_3 (inositol-1,4,5-triphosphate) et en DAG (sn-1,2-diacylglycérol). L' IP_3 hydrosoluble, agissant comme un messenger second, diffuse à travers le cytoplasme vers le réticulum endoplasmique dont il stimule la libération d'ions calciques en se liant à son récepteur-canal IP_3R ce qui permet son ouverture. Cette vidange calcique stimule l'ouverture de certains canaux TRPC. [46, 47]

En ce qui concerne le DAG, en étant lipophile, il est contraint de rester au niveau de la membrane plasmique où il agit comme messenger second en activant la PKC (protéine kinase C) en présence de PS (phosphatidylsérine) et de calcium. Cette enzyme membranaire phosphoryle à son tour et module ainsi l'activité d'autres canaux TRP.[46]

Le canal calcique ECaC appartient à la famille des TRPV et de ce fait il est appelé ECaC-TRPV5. Cette sous-famille contient 5 membres (TRPV1,2,4,5,6) divisés en trois groupes. Les mécanismes d'activation des canaux TRPV, anciennement connue sous le nom de « Osm-9-like », en référence aux protéines sensorielles OSM-9 de *C. elegans*, ne sont pas encore bien déterminés. TRPV1 est le canal ionique le plus étudié et le mieux compris dans cette sous-famille. Il est sensible à la capsaïcine, à la chaleur et ainsi il est impliqué dans le processus de la douleur. Les autres membres de cette sous-famille peuvent être activés par divers stimuli dont les lipides, les phorbols, la phosphorylation, l'osmolarité ou le calcium extracellulaire.[42, 44, 48]

En ce qui concerne le TRPV5 (ou ECaC), les mécanismes d'activation et de régulation de ce canal ne sont pas encore connus. Par contre, des études récentes ont démontré que ECaC est étroitement régulé par la

vitamine D₃. Avec son récepteur nucléaire VDR, la vitamine D₃ est impliquée dans l'augmentation de la transcription du gène ECaC. En effet, l'analyse du promoteur du gène de ECaC révéla de nombreux éléments potentiels de réponse au VDR. D'autres études ont indiqué (chez les souris VDR^{-/-}) une augmentation de l'excrétion du calcium qui serait causée par la diminution du niveau d'expression des transporteurs impliqués dans les mécanismes d'entrée du calcium au niveau apical du tubule distal. [35, 49, 50]

Plusieurs études ont été effectuées sur le canal calcique ECaC-TRPV5 afin de comprendre son importance dans la réabsorption du calcium et son fonctionnement. L'équipe du Dr Bindels a dernièrement démontré par l'étude des souris transgéniques que l'ablation du gène rénal ECaC-TRPV5 (TRPV5 ^{-/-}) conduit à une hyperabsorption intestinale du calcium et à une déformation de la structure du tissu osseux. Etant donné que le rein réabsorbe moins de calcium filtré, le calcium requis est récupéré grâce une augmentation de l'absorption du calcium au niveau intestinal et une diminution de la formation des os. Ces résultats démontrent ainsi l'importance du canal ECaC-TRPV5 dans la réabsorption rénale du calcium et son rôle primordial dans l'homéostasie du calcium. [51, 52]

1.3 Études moléculaires au niveau du pore

1.3.1 Les sites moléculaires responsables de la perméabilité calcique de ECaC

Les premières expériences effectuées dans notre laboratoire visaient à caractériser au niveau moléculaire la région du pore. [53]. Les résultats obtenus suite à la caractérisation électrophysiologique de ECaC dans les ovocytes de *Xenopus laevis* indiquaient que le canal présente une très haute affinité pour le calcium extracellulaire dans une solution de cations (Li⁺) monovalents (IC₅₀= 2.2 ± 0.4 μM) et une affinité plus faible pour le magnésium (IC₅₀= 235 ± 35 μM). Au niveau moléculaire, les expériences ont démontré que le résidu D542, retrouvé à l'intérieur de la région présumée du

pore, était responsable de l'affinité du canal pour les ions calcium et magnésium extracellulaires. Comparativement au canal ECaC de type sauvage, l'affinité pour les ions calcium du canal portant la mutation D542N était grandement diminuée ce qui a suggéré que, ce résidu acide avec une chaîne latérale polaire, possède les caractéristiques qui permettent la liaison des ions calcium avec une haute affinité. De plus, les diverses mutations effectuées sur le résidu D542 (D542E, D542A et D542G) entraînaient des modifications de l'affinité calcique, ce qui suggère que le volume, la charge et la polarité de la chaîne latérale de cet acide aminé, sont des caractéristiques déterminantes dans le mécanisme de sélectivité calcique du canal calcique ECaC. [53]

Etant donné que la topologie membranaire du canal calcique est similaire à celle proposée pour les canaux calciques dépendants du voltage avec six segments transmembranaires (S1 à S6) incluant une courte région hydrophobique entre les segments S5-S6, correspondant à la région présumée du pore, il a été suggéré que le filtre de sélectivité pour les ions calcium dans le canal ECaC est constitué d'un anneau formé de quatre résidus chargés négativement, dans une structure tétramérique, semblablement au canaux calciques dépendant du potentiel membranaire.[53]

I.3.2 La structure secondaire du pore de ECaC est similaire au canal KcsA : études de SCAM (*Substituted Cysteine Accessibility Method*)

La suite de l'étude sur le canal calcique ECaC-TRPV5 avait comme but d'étudier la structure secondaire de la région du pore. Lorsque la structure cristalline des protéines membranaires n'est pas encore obtenue, la méthode de SCAM est très souvent utilisée afin d'étudier les caractéristiques structurales de ces protéines membranaires. Brièvement, le SCAM consiste à introduire des résidus cystéines à différentes positions dans la région du pore de la protéine canal et de tester l'accessibilité de ces positions à

différents réactifs MTS solubles dans l'eau (MTSET, MTSEA, MTSES).[54, 55]

Les expériences de SCAM sont utilisées afin d'identifier les résidus dans la région du pore qui sont accessibles à l'eau ce qui permet de déterminer la topologie du vestibule externe. Dans le canal ECaC-TRPV5, 44 résidus de cystéine ont été introduits par mutagenèse dirigée, dans la région présumée du pore (à partir de la fin du segment S5, jusqu'au début du segment S6). 15 résidus sur 44 ont réagi aux réactifs MTS, suggérant ainsi que ces résidus sont accessibles au milieu aqueux. [56]

1.4 Sites potentiels de régulation de ECaC

Contrairement aux canaux TRPV1-4 qui sont activés en réponse aux stimuli externes, ECaC-TRPV5 est un canal constitutivement actif lorsqu'il est exprimé dans les ovocytes de *Xenopus* et les cellules HEK-293. [57, 58]

Jusqu'à présent, nous ne connaissons pas les stimuli qui contrôlent l'activation du canal ECaC-TRPV5. Mais la structure du canal permet d'identifier des sites potentiels qui peuvent être impliqués dans la régulation de l'activité : les sites consensus de phosphorylation par la PKA et PKC, les répétitions d'ankyrines et les motifs PDZ.

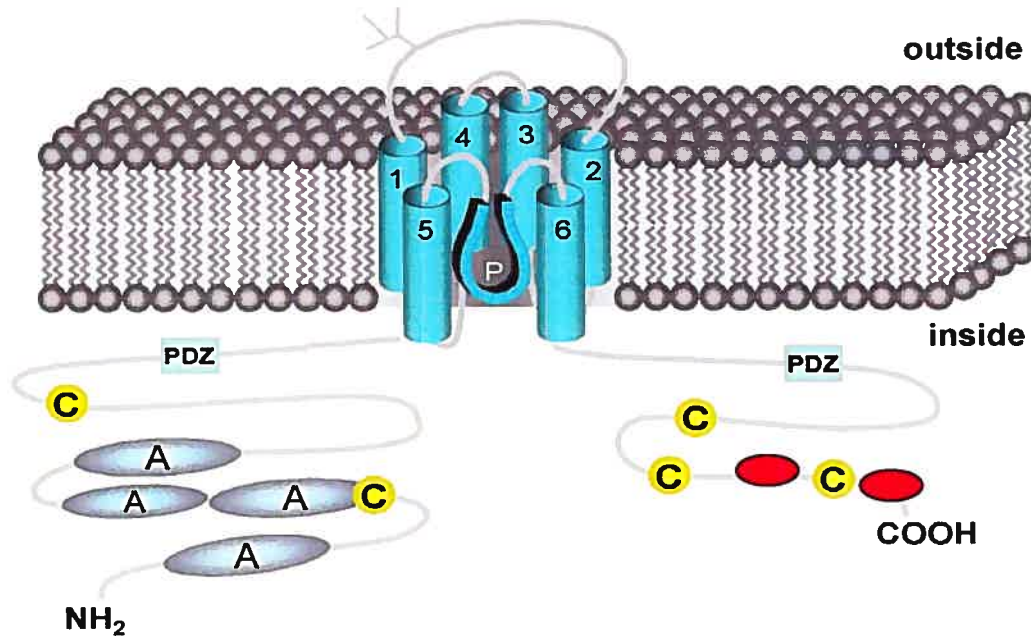


Figure 8 : Représentation de la structure du canal calcique ECaC-TRPV5 avec les sites potentiels de régulation

Le canal possède dans la partie amino-terminal quatre répétitions d'ankyrine (A) et deux motifs PDZ dans les deux extrémités. Les cercles jaunes représentent les sites potentiels de phosphorylation par la PKC (C pour PKC) et les cercles rouges représentent les sites potentiels de phosphorylation par la PKA. Adapté de Hoenderop, Nilius, Bindels. Ann. Rev. Physiol. 64: 529-49, 2002.

I.4.1 Le rôle de la phosphorylation

La régulation des canaux ioniques par la phosphorylation intracellulaire est un processus très important qui contrôle une grande variété de fonctions cellulaires. Plusieurs classes de canaux ioniques, incluant les canaux calciques, sodiques et potassiques sont régulées par la phosphorylation. [59]

Les mécanismes les plus communs impliquent une phosphorylation des canaux ioniques soit via la PKA ou soit via la PKC. La phosphorylation

par la PKA et la PKC sur les résidus sérine et thréonine change les propriétés des canaux en modifiant la cinétique d'activation et/ou le nombre de canaux actifs à la membrane plasmique.[60]

Malgré un grand nombre d'études effectuées sur la relation entre la fonction et la phosphorylation des canaux ioniques, on comprend encore mal le rôle de la phosphorylation sur la fonction des canaux en conditions physiologiques. Par contre, il a été démontré que la stimulation de la PKA induit une augmentation globale du courant calcique cardiaque de type L ainsi que les courants calciques de divers neurones, centraux ou périphériques.[61, 62] Les effets de la PKA et la PKC ont aussi été étudiés sur les canaux calciques exprimés à partir d'ARN tissulaire dans les ovocytes de *Xenopus*. L'injection d'ARN de cœur de rat conduit à l'expression de canaux de type L lorsque stimulés à la fois par la PKA et la PKC.[63-65] Les canaux L musculaires squelettiques sont aussi régulés par la PKA, il a été montré que la facilitation du courant calcique observée lors de stimulations répétitives, requiert une étape de phosphorylation par la PKA. [66, 67]

Les protéines kinases A et C régulent aussi d'autres canaux ioniques et transporteurs comme l'échangeur Na^+/H^+ de type 3 (NHE3), le canal CFTR («*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*») et le canal potassique ROMK. La phosphorylation des sous-unités β et γ du canal épithélial sodique (ENAC) par la PKC est impliquée aussi dans la régulation de ce canal.

Les motifs consensus de la phosphorylation par la PKA ([RK]-xx-[ST]) et par la PKC ([ST]-x-[RK]) sont retrouvés au niveau de la structure primaire du canal. Deux sites potentiels de phosphorylation par la PKA (S670 et T709) se retrouvent dans la région carboxy-terminale de ECaC-TRPV5 alors que les résidus S144, S298, S654, S664 et S698 seraient des sites

potentiels de phosphorylation par la PKC. Jusqu'à présent aucune étude n'a été effectuée sur ces sites de phosphorylation. Etant donné que la réabsorption du calcium dans le tubule distal du rein est régulée par différentes hormones qui stimulent G_s et G_q , cette stimulation peut directement ou indirectement réguler le canal ECaC-TRPV5 via les protéines kinases A et C. ECaC-TRPV5 pourrait être modulé par la PKC semblablement à certains canaux de type TRP.

1.4.2 Les répétitions d'ankyrine

La présence des répétitions d'ankyrine dans le N-terminal constitue une des plus importantes caractéristiques des canaux TRPC et TRPV. Les répétitions d'ankyrine ont été identifiées en 1987 dans la séquence de protéines régulatrices (Swi6p et Cdc10p) dans le cycle cellulaire de la levure par Breeden et Nasmyth. Par la suite, 24 copies de ce motif de 33 aa ont été découvertes dans la séquence de la protéine ankyrine, une protéine du cytosquelette, expliquant son nom.[68-70]

Les ankyrines forment une famille de protéines qui possèdent des sites de liaison pour les protéines du cytosquelette et les protéines membranaires comme la clathrine, la spectrine, l'échangeur anionique des érythrocytes et le canal sodique voltage dépendant.[71-76] Trois gènes codant pour l'ankyrine ont été identifiés chez les mammifères qui expriment tous une protéine avec la même organisation moléculaire.[72, 73]

Les répétitions d'ankyrine sont impliquées dans une grande variété d'activités biologiques et elles ont été identifiées dans plusieurs organismes. En effet, ce motif de 33 acides aminés a été trouvé dans plus de 400 protéines incluant des canaux ioniques, des enzymes, des toxines et des facteurs de transcription. [73, 77]

Ces molécules sont présentes dans le noyau, le cytoplasme et le milieu extracellulaire. Le nombre des répétitions varie énormément d'une protéine à une autre. Les répétitions d'ankyrine sont impliquées dans plusieurs fonctions cellulaires via des interactions protéine-protéine comme l'intégrité du cytosquelette, la régulation du transport ionique, la signalisation cellulaire, l'initiation de la transcription et la régulation du cycle cellulaire.[77]

La séquence primaire de la majorité des répétitions d'ankyrine correspond à la séquence suivante : GxTPLHxAxGHxxxV/AxxLLxxGxxN/Dxxxx. La structure tertiaire des répétitions d'ankyrine est formée de deux hélices α séparées par un feuillet β . C'est au niveau des feuillets β que les interactions avec des protéines cibles s'effectuent. Contrairement aux motifs SH2 et SH3, il n'y a pas de séquence spécifique ou de motif structural pour la liaison des répétitions d'ankyrine. En plus, les répétitions d'ankyrine d'une protéine donnée ne se lient pas spécifiquement à une seule classe de protéine cible. Etant donné la diversité de leurs fonctions biologiques, elles peuvent se lier à plusieurs protéines cibles.

Comme la majorité des canaux de type TRP, il existe quatre répétitions d'ankyrine dans le début du N-terminal du canal ECaC-TRPV5. Il a été démontré que l'ankyrine empêche la relâche calcique à partir des réserves intracellulaires en inhibant le récepteur à l' IP_3 et le récepteur à la ryanodine, qui jouaient un rôle important dans l'activation des canaux TRP. Etant donné que les répétitions d'ankyrine sont très conservées dans la majorité des membres de la famille TRP, il a été suggéré que probablement ce motif joue un rôle essentiel dans la fonction des canaux TRP.[78-80] De plus, les répétitions d'ankyrine peuvent aussi être impliquées dans l'assemblage des sous-unités. ECaC-TRPV5 étant un oligomère formé de 4 sous-unités, ce motif pourrait permettre l'interaction des sous-unités afin de former une protéine fonctionnelle.[81]



Figure 9 : Modèle structural des répétitions d'ankyrine de ECaC-TRPV5 obtenu par homologie

Les hélices α sont séparées par des feuillets β . Certains résidus des feuillets β contribuent à la stabilisation de l'interaction avec la protéine cible.

I.5 La technique double-hybride chez la levure

Les interactions de type protéine-protéine jouent un rôle crucial dans la plupart des processus biologiques. Parmi les approches expérimentales permettant de caractériser de telles interactions entre partenaires protéiques, l'une des plus performantes est actuellement représentée par le système de double hybride développé dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Cette technique a été mise au point en 1989, par deux chercheurs américains,

Stanley Fields et Ok-Kyu. Le principe du système repose sur l'utilisation des propriétés de nombreux facteurs transcriptionnels des eucaryotes. Ces derniers présentent, en effet, deux domaines fonctionnels distincts : un domaine capable de se lier à l'ADN au niveau des séquences spécifiques, un autre domaine capable d'activer la transcription. En utilisant la propriété modulaire de ces facteurs transcriptionnels, il est possible de mettre en évidence une interaction entre deux protéines X et Y par expression dans la levure de deux molécules hybrides fusionnées respectivement au domaine de liaison à l'ADN et au domaine d'activation transcriptionnelle.[82, 83]

À l'origine, le système mis au point utilise la protéine Gal4, qui est présente naturellement chez la levure. Le rôle de Gal4 est d'activer différents gènes intervenant dans le métabolisme du galactose en se fixant sur des séquences appelées UASG («*upstream activating sequence GAL*»), régulant ainsi la transcription des gènes. Séparément chaque molécule hybride est incapable d'induire dans la levure une activation de la transcription des gènes rapporteurs (il s'agit du gène bactérien LacZ et du gène de levure HIS3) placés sous le contrôle de séquences nucléotidiques spécifiques.

La souche rapportrice utilisée possède les gènes rapporteurs HIS3 et LacZ dont le promoteur est placé sous la dépendance de séquences capables de lier spécifiquement le domaine de liaison à l'ADN de Gal4. L'interaction des deux protéines X et Y va permettre le rapprochement des deux domaines fonctionnels et l'activation de la transcription des gènes rapporteurs. La mise en évidence de l'interaction se traduit dans la levure par l'activation du gène LacZ révélée par l'expression de l'activité de la β -galactosidase et l'activation du gène HIS3 qui va conférer aux levures la capacité de pousser sur un milieu de culture dépourvu d'histidine.

La technique du double hybride est très souvent utilisée pour cribler une banque d'ADNc afin de déterminer des protéines interagissantes avec la

protéine d'intérêt. Ultérieurement des variantes de ce système ont été développées. L'une d'entre elles consiste à remplacer le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 par celui du répresseur Lex A des gènes SOS d'*E coli*. Cette variante nécessite l'utilisation d'une souche rapportrice dont les gènes rapporteurs sont alors placés sous la dépendance de sites capables de lier spécifiquement la protéine Lex A. De la même façon, le domaine d'activation Gal4 peut être indifféremment remplacé par d'autres types d'activateurs transcriptionnels et notamment le domaine d'activation de la protéine VP16 du virus de l'Herpes simplex. Cette technique génère également de nombreux faux-positifs et pour confirmer l'interaction observée par le système du double hybride, on utilise par la suite d'autres systèmes comme la co-immunoprecipitation ou la chromatographie d'affinité.

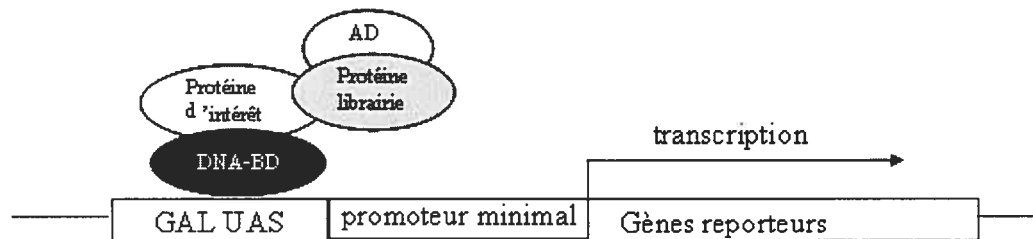


Figure 10 : Le principe du système du double hybride

La première étape de la réponse de GAL-4 consiste à la liaison du domaine de liaison à l'ADN de GAL-4 (DNA-BD) à une séquence activatrice GAL-UAS (UASG pour «*upstream activating sequence GAL*»), en amont des gènes rapporteurs. Par la suite, le domaine d'activation de GAL-4 (AD) vient se lier ce qui enclenche la transcription des gènes rapporteurs, donc la réponse de GAL-4.

I.6 Hypothèse de travail

Le but principal de ce travail de maîtrise était d'étudier la régulation du canal calcique ECaC-TRPV5 par la phosphorylation et les répétitions d'ankyrine.

Il a été démontré que dans les cellules isolées du tubule distal du rein de lapin, la réabsorption du calcium via la voie transcellulaire est régulée par la PTH via l'activation de la PKA.[84] Il est aussi connu que la PTH augmente les niveaux intracellulaires d'AMP cyclique et stimule la PKC.[85-87] La structure moléculaire de ECaC-TRPV5 présente des sites potentiels consensus de phosphorylation par la PKA et la PKC. Il est constitutivement actif lorsqu'il est exprimé dans les ovocytes de *Xenopus* et le canal se désensibilise lorsqu'il est exposé au calcium. En se basant sur ces faits, nous avons proposé que ECaC-TRPV5 est constitutivement phosphorylé sous nos conditions expérimentales et l'augmentation intracellulaire de calcium via ECaC-TRPV5 active des phosphatases dépendant du calcium qui à leur tour viennent déphosphoryler le canal, ce qui conduit au désensibilisation du canal.

Quatre répétitions d'ankyrine sont présentes dans le N-terminal du canal ECaC-TRPV5. La délétion des répétitions d'ankyrine dans TRPV4 abolit complètement des courants activés par la chaleur lorsque exprimé dans les cellules CHO et HEK-293.[88] Sachant l'implication des répétitions d'ankyrine dans les interactions protéine-protéine et leur rôle dans l'assemblage des canaux ioniques, nous avons étudié dans un deuxième temps, par délétion de ce motif et à l'aide du système double-hybride, l'implication de ces répétitions dans l'expression fonctionnelle de ECaC-TRPV5.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

II.1 Expression et caractérisation fonctionnelle de ECaC-TRPV5 sauvage et des mutants

II.1.1 Sous-clonage de ECaC-TRPV5

Le canal calcique ECaC-TRPV5 (GenBank™ AJ133128) a été obtenu par Hélène Klein, Ph. D, après une transcription inverse de l'ARNm provenant du tubule distal de rein de lapin, tel que décrit précédemment [53]. L'ADN a été cloné dans le vecteur pT7TS (généreusement fourni par Dr Paul A. Krieg, University of Arizona, Phoenix) en utilisant l'exonucléase III. Le vecteur pT7TS est une copie modifiée du vecteur pGEM-4Z (Clontech, Palo Alto, CA) qui contient les régions non transcrites 5' et 3' de l'ARNm du gène de la β -globine de *Xenopus laevis*, lequel assure une expression optimale de la protéine-canal dans les ovocytes. Pour nos expériences d'immunobuvardage, le canal a aussi été sous-cloné dans le vecteur pCMV-Tag5A (Stratagene, LaJolla, CA) entre les sites *NotI* et *HindIII*, ce qui permet l'expression fonctionnelle du canal dans les cellules de mammifères et dans les ovocytes de *Xenopus laevis* afin de faire des études d'immunobuvardage grâce à l'épitope c-myc présent dans le vecteur.



Figure11: Représentation des plasmides utilisés pour le sous-clonage de ECaC

II.1.2 Mutagenèse dirigée par PCR («*polymerase chain reaction*»)

Les mutations ponctuelles et multiples S144A, S298A, S654A, S664A, S698A, S669A, T709A, 78NheI-112NheI, 78NheI-150NheI, 78NheI-187NheI (c'est-à-dire la création du site de restriction *NheI*) ont été réalisées avec la trousse commerciale « *QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis* » (Stratagene, LaJolla, CA) en suivant les directions du manufacturier. Deux oligonucléotides de 39 à 45 nucléotides de longueur (sens et antisens), sont utilisés pour introduire les mutations. L'ADN parental non-muté a été par la suite, digéré par l'enzyme de restriction *Dpn I* qui clive les sites de méthylation des résidus adénine (N⁶-methyladenine). L'ADN muté a été transformé dans les bactéries XL-Gold ultra-compétentes et la mutation a été vérifiée par séquençage automatisé (Bio S&T, Lachine, Québec).

Une fois que la mutation a été confirmée, l'ADN muté a été amplifié dans les bactéries *E. coli* DH5 α rendues compétentes par la méthode classique au CaCl₂. La purification de l'ADN plasmidique est effectuée en utilisant la trousse « *QIAfilter™ Plasmid Midi* » (Qiagen, Mississauga, Ont).

Les délétions ECaC- Δ ANK1 (Δ N78-112), ECaC- Δ ANK1-2 (Δ N78-150), ECaC- Δ ANK1-3 (Δ N78-187) ont été obtenues après la digestion par l'enzyme de restriction *NheI* dont les sites ont été précédemment introduits par mutagenèse. Brièvement, on migre l'ADN digéré sur gel d'agarose 1% puis les fragments sont purifiés avec la trousse Sephaglas™BandPrep (Amersham, Piscataway, NJ) qui est basée sur la fixation de l'ADN sur les billes de Sephaglas et permet ainsi la purification. La ligation de ces fragments est réalisée avec la ligase du phage T4 (NEB, Mississauga, Ont) qui catalyse la formation d'une liaison entre l'extrémité 3'-hydroxyle d'un brin d'ADN et l'extrémité 5'-phosphate de l'autre brin. Le séquençage a permis de vérifier que l'ADN demeure dans le cadre de lecture.

II.1.3 Transcription *in vitro*

La transcription *in vitro* est le processus par lequel l'ARN polymérase transcrit l'ARN à partir d'une matrice d'ADN. Ces transcrits sont utilisés pour la microinjection dans les ovocytes de grenouille, *Xenopus laevis* (voir plus bas pour les détails). La transcription *in vitro* a été réalisée avec la trousse commerciale mMESSAGE mMACHINE™ (Ambion, Austin, TX). Dans un premier temps, l'ADN est linéarisé avec une enzyme de restriction, possédant un site unique soit *BamHI* pour pT7TS-ECaC et *MluI* pour pCMVTag5-ECaC puis purifié par des extractions phénol/chloroforme. Par la suite, la transcription est réalisée avec la polymérase T7 pour le vecteur pT7TS et la polymérase T3 pour le vecteur pCMVTag5. L'ajout de l'ADNase permet d'éliminer la matrice d'ADN. L'ARN est finalement purifié par des extractions de phénol/chloroforme aussi et resuspendu dans de l'eau exempte d'ARNase.

II.1.4 Traduction *in vitro*

La trousse commerciale « TNT® Quick Coupled Transcription/Translation Systems » (Promega, Madison, WI) a été utilisée pour faire la traduction *in vitro* de ECaC-ΔANK1-3 (ΔN78-187). Une petite quantité d'ADN circulaire est ajoutée à l'aliquot de réticulocytes de lapin qui synthétise l'ARN et traduit en protéine après une incubation de 1 heure à 30°C.

II.1.5 Injection dans les ovocytes de Xénope

L'ARN transcrit *in vitro* est injecté dans le cytoplasme alors que l'ADN est injecté dans le noyau des œufs de grenouille, *Xenopus laevis* (Nasco, Fort Atkinson, WI) avec un micro-injecteur automatisé à volume variable (WPI, Sarasota, FL) qui permet d'ajuster très précisément le volume injecté (4.6nl à 46nl). L'ADN est co-injecté avec pMT21-rGFP (0.15μg/μl)[89] qui, en produisant une protéine verte, fluorescente, permet la sélection des œufs qui ont exprimé la protéine-canal injectée.

II.1.6 Enregistrements électrophysiologiques en voltage imposé

Les courants associés au canal ECaC-TRPV5 ont été mesurés à la température ambiante à l'aide de la technique du voltage imposé à deux-électrodes, selon la méthode publiée précédemment [53], en utilisant un amplificateur de voltage imposé (OC-725, Warner Instruments, Hamden, CT). Les électrodes de courant et de voltage (résistance de 1-2 M Ω) ont été remplies avec une solution de KCl 3M, EGTA 1mM et HEPES 10mM (pH 7.4). Les relations courant-voltage instantanées ont été mesurées en utilisant des rampes de voltage de +80 à -150 mV à un taux de 0.5 mV/ms à partir d'un potentiel de -50mV. Les courbes courant-voltage en configuration cellule entière sont d'abord mesurées sous des conditions témoins, c'est à dire en présence de la solution de Li⁺ sans Ca²⁺ (LiOH 120 mM, EGTA 5 mM, KOH 2 mM, HEPES 20 mM, pH 7.35 avec l'acide méthanesulfonique). Les courants en Li⁺ sont ensuite inhibés de façon réversible par le calcium extracellulaire avec Ki \approx 2 μ M. Les ovocytes sont perfusés par gravité à une vitesse de 10ml/min. La série de logiciel pClamp 6.02, (Axon Instruments, Foster City, CA) a été utilisée pour l'acquisition et l'analyse des résultats. Les données ont été échantillonnées à 10 kHz et filtrées à 5 kHz en utilisant le filtre incorporé à l'amplificateur.

II.1.7 Culture cellulaire et transfections

Les cellules HEK-293 sont mises en culture dans du milieu DMEM « *Dulbecco modified eagle medium high glucose* » (Invitrogen, Mississauga, Ont) supplémenté avec FBS 10% (Invitrogen, Mississauga, Ont), de la pénicilline à 100 unités/ml (Invitrogen, Mississauga, Ont) et de la streptomycine 100 μ l/ml (Invitrogen, Mississauga, Ont) sous une atmosphère de 5% CO₂ à 37°C.

Pour les expériences de transfection transitoire, les cellules sont ensemencées à une densité de 5×10^6 cellules par plat de 10 cm de diamètre. Les transfections avec les délétions d'ankyrines (ECaC- Δ ANK2, ECaC- Δ ANK2-3, ECaC- Δ ANK2-4) ont été réalisées avec le SuperFect® Transfection Reagent (Qiagen, Mississauga, Ont) selon les recommandations du manufacturier. Brièvement, pour chaque plat de cellule, 10 μ g d'ADN et 40 μ l de SuperFect (3mg/ml) ont été mélangés dans un volume total de 300 μ l de milieu DMEM sans sérum. Ce mélange est incubé 15 minutes à la température ambiante avant d'y ajouter 3 ml de milieu DMEM avec sérum. Les cellules ont été lavées deux fois avec du PBS (NaCl 140 mM, KCl 2.7 mM, Na_2HPO_4 2.7 mM, KH_2PO_4 2.7 mM) puis incubées pendant 2 heures à 37°C, 5% CO_2 , avec le milieu de transfection contenant le SuperFect. Les cellules sont ensuite lavées avant d'ajouter 10mL de DMEM. Après 48 heures d'incubation à 37°C, les cellules sont utilisées pour des expériences d'immunobuvardage.

II.1.8 Préparation membranaire des ovocytes

Les œufs injectés sont brisés dans du PBS (voir II.1.7) et inhibiteurs de protéases (# catalogue P2714, Sigma, Mississauga, Ontario) à une dilution 1/1000 avec un homogénéisateur (Polytron, Fisher). Deux centrifugations de 10 minutes à 960 rcf permettent d'isoler les débris cellulaires et une centrifugation de 20 minutes à 10 000 rcf permet de récupérer les membranes.

II.1.9 Lysat membranaire des cellules HEK-293

Les cellules transfectées sont laissées en culture pendant deux jours. Par la suite, elles sont lavées deux fois avec du PBS et une fois avec de l'eau distillée. Le tampon de lyse (Tris-HCl 1M pH 8.0, EDTA 0.5 M pH 8.0, inhibiteurs de protéases) est ajouté dans chaque plat. Les cellules sont grattées et les membranes sont brisées en aspirant avec une seringue. Une première centrifugation effectuée pendant 5 min, à 3000 rpm permet de

sédimenter les noyaux et le culot des protéines est récupéré à la suite d'une centrifugation de 30 minutes à 14 000 rpm à 4°C.

II.1.10 Dosage des protéines

Le dosage des protéines est effectué avec le réactif BCA («*bicinchoninic acid*», Pierce, Rockford, IL) qui est basée sur la méthode de Lowry. La concentration des protéines est généralement déterminée en référence à une courbe-étalon en utilisant des concentrations différentes de BSA (*bovine serum albumin*). Le dosage est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre (Beckman, Fullerton, CA) à une longueur d'onde de 562 nm.

II.1.11 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide après leur dénaturation dans du tampon Laemmli 3X (β -mercaptoéthanol 15%, SDS 7.5%, glycérol 30%, Tris-HCL 300 mM pH 6.8 et bleu de bromophénol). Les protéines sont dans un premier temps concentrées sur le gel d'entassement (Tris-HCL 375 mM pH 8.8, SDS 0.1 %, acrylamide 4%, TEMED 0.1%, ammonium sulfate 0.05%) puis séparées sur le gel de séparation (Tris-HCL 375 mM pH 8.8, SDS 0.1 %, acrylamide, TEMED 0.1%, ammonium sulfate 0.1%). Différentes concentrations d'acrylamide (7.5% -10%- 18%) sont utilisées pour permettre une meilleure séparation selon le poids moléculaire de la protéine étudiée. La migration est effectuée en utilisant le système *Hoefler* (gros gel, 14cmX16cm) ou *BioRad* (petit gel, 7cmX8cm) avec le tampon d'électrophorèse (Tris-base 25.2 mM, glycine 218.5 mM, SDS 0.1%). Les protéines sont migrées à 120 V pendant 2h pour un petit gel et à 30mA pendant 4h pour un gros gel.

Après l'électrophorèse, les protéines sont transférées (2h à 100V ou toute la nuit à 20V) sur une membrane de nitrocellulose Hybond™-C Extra

(Amersham, Piscataway, NJ) avec le tampon de transfert (glycine 120 mM, Tris-base 15.7 mM).

Le transfert des protéines est vérifié par révélation au rouge ponceau (rouge ponceau 0.5%, acide acétique glacial 1%). Ceci permet de vérifier que toutes les pistes contiennent la même quantité de protéines.

II.1.12 Traitement de la membrane de nitrocellulose et Immunodétection

La membrane est tout d'abord bloquée avec du tampon de blocage (PBS contenant du lait écrémé 5%, Tween-20 0.1%) et traitée avec un anticorps primaire, anti-c-myc (Cedarlane Laboratories Limited Hornby, ON) à une dilution de 1/500 pour ECaC-TRPV5 et anti-HA (Roche Pharmaceuticals, Indianapolis) à une dilution de 1/500) pour les clones obtenus par double-hybride. La membrane est par la suite incubée avec un anticorps secondaire (anti-souris-HRP, 1/5000, Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). L'anticorps anti-HA est directement couplé à HRP (*horseradish peroxidase*) donc il n'y a pas d'anticorps secondaire pour celui-ci.

Les protéines qui sont liées à l'anticorps sont révélées par chimioluminescence ECL (Mandel, St-Laurent, Qc) sur un film Kodak BioMax Light (BML).

II.2 Interaction protéine-protéine : technique du double hybride dans la levure

II.2.1 Construction de l'appât

Nous avons utilisé comme appât, les 3 répétitions d'ankyrine se trouvant dans la partie N-terminal du canal calcique ECaC-TRPV5 (les acides aminés 78-187). Dans un premier temps, la région 78-187 de ECaC (ANK) contenant les 3 répétitions d'ankyrine, a été amplifiée par PRC avec

l'enzyme *Taq DNA Polymerase* (Qiagen, Mississauga, Ont) à l'aide d'amorces qui contiennent un site de *XmaI* en 5' et un site de *NdeI* en 3' qui ont permis ensuite le sous-clonage dans le vecteur pGBKT7 (Clontech, Palo Alto, CA). La construction a été séquencée par séquençage automatisé (Bio S&T, Lachine, Québec) pour s'assurer que le cadre de lecture est respecté.

II.2.2 Transformation dans les levures *Saccharomyces cerevisiae*

Les souches de levures AH109 (Clontech, Palo Alto, CA) et Y187 (Clontech, Palo Alto, CA) ont été spécialement conçues pour être utilisées dans le système de double hybride. Ces levures contiennent des gènes rapporteurs spécifiques sous le contrôle de GAL-4. La transcription de ces gènes rapporteurs permet la sélection des levures lorsque nous utilisons un milieu sélectif. Donc dans un premier temps, le phénotype de ces souches a été vérifié sur différents milieux sélectifs : les levures ne survivent pas sur les milieux de culture dépourvus d'un de ces acides aminés suivants : leucine, tryptophane et histidine ou de la base azotée adénine.

Par la suite, la construction pGBKT7-ANK a été introduite dans la souche AH109 en utilisant la méthode de transformation LiAC (en suivant les recommandations du manufacturier, Clontech, Palo Alto, CA). Brièvement, une culture O/N («*overnight*») est préparée dans le milieu YPD («*Yeast extract, Peptone, Dextrose*») et lorsque la DO_{600} a atteint 0.2-0.3, le culot des levures est resuspendu dans du TE/LiAC stérile (TE : Tris-HCl 0.1M, EDTA 10mM pH 7.5, LiAC : acétate de lithium 1M, pH 7.5). Un volume de 100µl de ces levures compétentes a été mélangé avec 0.1 µg d'ADN (pGBKT7-ANK), 0.1 µg d'ADN de sperme de saumon (Clontech, Palo Alto, CA) et 0.3 ml de PEG-40% («*polyethylene glycol*»)/LiAC-TE puis incubé à 30°C pendant 30 min avec agitation. Un choc thermique de 15 min à 42°C est réalisé après l'ajout de 35 µl de DMSO («*dimethyl sulfoxide*»). Les levures ont finalement été étalées sur un milieu dépourvu de tryptophane et incubé à 30°C pendant

3-4 jours. Les levures ayant transformé l'ADN ont poussé grâce au gène de sélection TRP (tryptophane) se trouvant sur le vecteur pGBKT7 qui permet aux levures de produire cet acide aminé.

II.2.3 Criblage de la librairie d'ADNc prétransformée par la méthode de fusion de levures

Notre construction a été fusionnée à une librairie d'ADNc rénale humaine prétransformée dans les levures *S. cerevisiae* de souche Y187 (Clontech, Palo Alto, CA). La librairie d'ADNc commerciale a été sous-clonée dans le vecteur pACT2 entre les sites *XhoI* et *EcoRI*. Ce vecteur permet aux levures de survivre sur milieu dépourvu de l'acide aminé leucine grâce au gène de sélection LEU (leucine).

Le criblage est réalisé par la fusion de la levure haploïde AH109 de sexe mat a et de la levure haploïde Y187 de sexe mat α pour donner une levure diploïde. Ainsi, les levures AH109 et Y187 qui possèdent chacune un plasmide différent formeront des levures diploïdes qui posséderont les deux plasmides.

Pour la réalisation de la fusion, quelques colonies fraîches de levures transformées avec le plasmide pGBKT7-ANK sont inoculées dans 50ml de YPDA («*Yeast extract, Peptone, Dextrose, Adenine*»). Pour favoriser l'aération, le tout est mis dans des tubes de 250 ml. La culture de levure est incubée à 30°C pour 24 heures avec une agitation de 250 rpm. Lorsque la DO_{600} a atteint 0.8 (environ 24 heures d'incubation), la culture entière est centrifugée à 1000g pour 5 min et le culot est resuspendu dans le milieu résiduel (\approx 5ml).

La librairie rénale humaine (1ml) dont les ARNm ont été extraits de huit reins humains puis transcrits en ADNc (3.5×10^6 clones de 0.5 à 4.0 kb), a été décongelée à la température de la pièce. Le contenu est vortexé avant

qu'une quantité de 10µl soit gardée pour titrer la librairie. Le titrage de la librairie consiste à faire une série de dilutions à partir du 10 µl prélevé de la librairie dans du YPDA (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5}) et d'étaler 100 µl de chacune de ces dilutions sur des pétris sélectifs SD/-Leu, afin d'évaluer l'efficacité de la transformation de la librairie. Les pétris sont incubés à 30°C pour 2 à 4 jours.

Un volume de 5ml de la culture de levure AH109 contenant notre plasmide d'intérêt est combiné avec le 1ml de la librairie dans un erlenmeyer de 2 litres en présence de 45ml de YPDA/Kan(10-15µg/ml). L'utilisation de l'erlenmeyer de 2 litres est nécessaire pour une bonne aération ce qui favorisera la fusion. L'erlenmeyer est incubé à 30°C pour une période de 24 heures avec une agitation de 50 rpm.

Les vecteurs pGBKT7-p53 (Clontech, Palo Alto, CA) et pGADT7-T (Clontech, Palo Alto, CA) transformés ont été fusionnés de la même façon (témoins positifs) pour vérifier le système de réponse de GAL-4.

Lorsque la fusion est terminée, le mélange est centrifugé pendant 10 min à 1000g. Le culot est rincé et resuspendu avec 10ml de milieu YPDA/Kan. Une autre centrifugation est effectuée à 1000g pour 10min. De nouveau, le surnageant est enlevé et le culot est rincé et resuspendu dans YPDA/Kan. Le tout est centrifugé à 1000g pour 10min. Le surnageant est enlevé et le culot est resuspendu avec 10ml de YPDA/Kan. Le mélange est étalé sur des pétris (200µl/pétri) avec une sélection rigoureuse, soit des pétris -Leu/-Trp/-His. Les pétris sont incubés à 30°C pour une période de 2 semaines. S'il y a une interaction entre notre protéine d'intérêt et une protéine de la librairie, il y aura transcription des gènes rapporteurs de la levure suite à l'induction de la réponse GAL-4 et les cellules pourront ainsi pousser sur le milieu sélectif -Leu/-Trp/-His. L'interaction est par la suite confirmée par le test β-Gal, ce qui consiste à ajouter le X-gal (le substrat de

la β -Gal) pour vérifier l'activation du gène rapporteur *Lac Z*. L'hydrolyse de ce substrat par la β -galactosidase codée par le gène *Lac Z* colore les colonies positives en bleu.

II.2.4 Extraction des plasmides de la levure

Les levures ont la propriété de pouvoir intégrer plusieurs plasmides, donc l'extraction de ces plasmides est nécessaire pour ensuite être en mesure de déterminer lequel interagit avec notre protéine d'intérêt, pGBKT7-ANK. Dans un premier temps, une quantité de levure de chaque clone est inoculée dans 5ml de milieu liquide en absence de leucine (-Leu). Le tout est incubé à 30°C toute la nuit à une vitesse d'agitation de 250rpm. La culture de levure est centrifugée à 10000g pour 5min. Le surnageant est enlevé doucement et le culot est resuspendu dans le liquide résiduel. Par la suite, 0.2ml du tampon de lyse (Triton X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100mM, Tris pH 8.0 10mM, EDTA 1mM), 0.2ml phénol-chloroforme-alcool isoamyle (25: 24: 1) et 0.3g de billes de verre (425-600 microns #cat G-8772, Sigma, Mississauga) sont ajoutées à la suspension de levure. La membrane plasmique est brisée en vortexant vivement pendant 2 minutes. Le tout est centrifugé pendant 5 minutes à 15000g et le surnageant contenant l'ADN plasmidique est récupéré.

II.2.5 Transformation par électroporation

Afin d'amplifier l'ADN plasmidique extrait, ce dernier est transformé par électroporation dans les bactéries électrocompétentes avec un taux de transformation de 10^{12} cfu. L'électroporation consiste à soumettre le mélange ADN + bactéries à des chocs électriques. Le champ électrique provoque la déstabilisation de la membrane plasmique et induit la formation de "trous" à travers lesquels l'ADN peut transiter. Ce phénomène est réversible si le choc électrique n'a pas été trop violent alors la membrane peut reprendre son état initial.

Pour la transformation, les cellules électrocompétentes *E.coli* TOP10 (Invitrogen, Toronto, Ont) sont mélangées avec 2µl de l'ADN. Le mélange est déposé dans une cuvette de 1mm spécialement conçu pour l'électroporation qui est placée dans l'électroporateur (BioRad, Hercules, CA). Une pulsion est donnée selon les paramètres suivants: le voltage étant de 1.5 kV, la capacitance de 25µf et la résistance de 200Ω. La pulsion terminée, 450µl de milieu SOC est immédiatement ajouté aux cellules et le tout est incubé à 37°C pour 1heure avec une agitation de 250rpm. Une petite quantité (200µl) du mélange est étalée sur du milieu LB-Agar (*Lennox L Broth Base*) contenant l'antibiotique de sélection qui est l'ampicilline. Par la suite, l'ADN plasmidique est purifié avec la trousse «QIAfilter™ Plasmid Midi» (Qiagen, Mississauga, Ont). Le séquençage automatisé (Bio S&T, Lachine, Québec) a permis d'identifier les clones isolés qui ont interagi avec la protéine d'intérêt.

II.2.6 Lysat cellulaire des levures

Les protéines sont isolées à partir d'une culture liquide des levures fraîches (maximum 3 jours sur pétri). Aussitôt que la DO₆₀₀ atteint 1, les levures sont récupérées par centrifugation et resuspendues dans le tampon de lyse (Tris pH 7.4 20mM, NaCl 150 mM, EDTA 2mM, Triton X-100 0.2%, inhibiteurs des protéases). La membrane plasmique est brisée en vortexant avec 1.5g de billes de verre (425-600 microns, Sigma). Le surnageant contenant les protéines est récupéré après une centrifugation de 5 min à 450 g.

Les protéines sont ensuite analysées par immunobuvardage selon le protocole décrit à la section II.1.11.

III. RÉSULTATS

III.1 Rôle de la phosphorylation

La phosphorylation ou la déphosphorylation peuvent moduler l'activité de plusieurs canaux ou transporteurs. Il a été démontré que l'activation de la PKA phosphoryle le canal TRPV1 (VR1) et prévient la désensibilisation du canal. (Bhave G et al, 2002). Il a aussi été démontré que le résidu Serine116 de TRPV1 est responsable de cette régulation. Etant donné que ECaC-TRPV5 se désensibilise suite à l'ajout de calcium et qu'il présente des sites potentiels de phosphorylation par la PKA et la PKC, nous avons étudié par mutagenèse dirigée des sites consensus de phosphorylation par la PKA ou la PKC et par des études électrophysiologiques l'implication de ces sites sur la désensibilisation du canal. Cette approche permet de déterminer si l'état de phosphorylation peut moduler l'activité du canal ECaC-TRPV5.

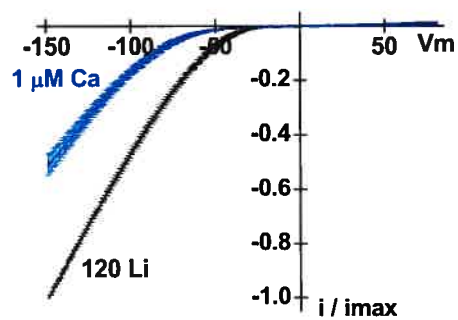
Afin d'étudier le rôle de la phosphorylation dans l'activation du canal ECaC-TRPV5, des mutations simples ont été réalisées. Les sites consensus de phosphorylation par la PKC (S144, S298, S654, S664, S698) et par la PKA (S670, T709) se trouvant dans la partie intracellulaire du canal, ont été mutés en alanine, afin d'empêcher toute phosphorylation possible sur ces résidus. Par la suite, ces sites ont été mutés en combinaison (mutations multiples) afin d'évaluer l'effet de la phosphorylation sur la désensibilisation du canal. Après le séquençage de la région codant contenant la mutation, l'expression fonctionnelle des mutants a été testée par électrophysiologie (par la méthode de voltage imposé) après injection de l'ARNm codant pour le canal. Les courants ont été enregistrés sur les ovocytes injectés après une incubation de 20-36 heures dans une solution physiologique en absence de calcium (0 Ca^{2+} , 0 EGTA) pour éviter une surcharge calcique. La première série d'expérience visait (figures 12,13,14) à évaluer l'intégrité de nos constructions en mesurant les propriétés biophysiques des mutants, soit l'affinité du canal pour les ions Ca^{2+} (qui devrait être déterminée

principalement par D542, [53]) et la rectification entrante de la courbe I/V. Une série de rampe de potentiels est appliquée à partir d'un potentiel de maintien de -50mV (de $+80\text{mV}$ à -150mV) en absence de Ca^{2+} libre (Li^+ 120mM , Ca^{2+} libre $< 1\text{mM}$, voir Mat&Méthodes). En effet, 5mM de EGTA est ajouté aux solutions salines pour éliminer tout le Ca^{2+} libre. Chaque mutation a été testée au moins trois fois et les courants ont été normalisés par rapport à la valeur maximum obtenue à -150mV . Donc chaque tracé est la moyenne d'au moins trois expériences effectuées sous les mêmes conditions. Tel que le montre les figures 12, 13 et 14, toutes les mutations ont produit des courants (tracé noir) dont la courbe I/V macroscopique en présence de cations monovalents (Li^+) rectifie complètement aux potentiels positifs (rectification entrante). Des études antérieures ont démontré que le Li^+ est préféré aux autres cations monovalents (Na^+ , K^+ , Cs^+) puisque cet ion génère des courants plus stables dans les œufs de *Xenopus*.

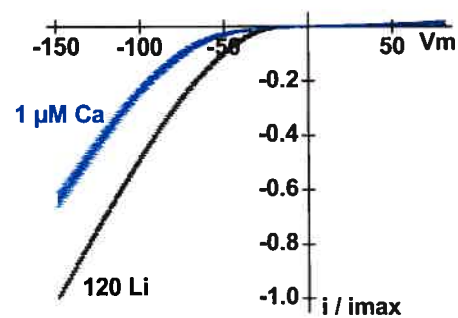
La deuxième série d'expérience visait à évaluer l'affinité des mutants pour l'ion Ca^{2+} . Tel que discuté dans Jean et al, 2002 [53], le canal sauvage ECaC-TRPV5 est canal un cationique qui laisse passer les cations monovalents avec une grande conductance en absence complète d'ions Ca^{2+} dans le milieu extracellulaire. L'addition de $1\mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre dans le milieu externe inhibe environ 50% l'amplitude des courants ($K_i = 2 \pm 1\mu\text{M}$) en Li^+ (tracé bleu par rapport au tracé noir). Les résultats obtenus démontrent que la constante d'inhibition n'a pas été modifiée avec la création des mutations simples et multiples effectuées sur les sites de phosphorylation car les courbes I/V sont similaires au canal sauvage, suggérant ainsi que les propriétés biophysiques de ECaC-TRPV5 n'ont pas été changées.

III.1.1 PKC : Mutations simples

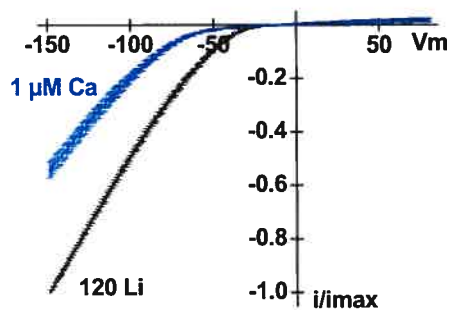
A ECaC (sauvage)



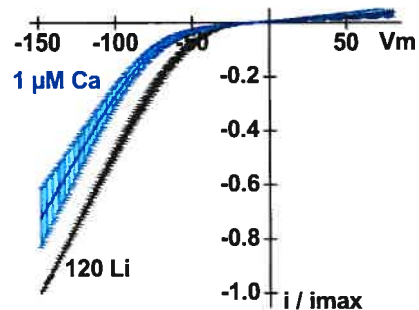
B S144A



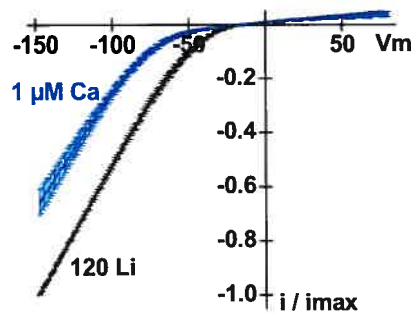
C S298A



D S654A



E S664A



F S698A

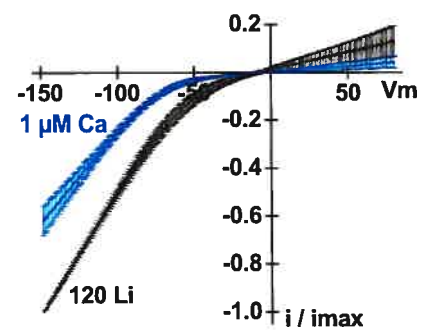


Figure 12: Les mutations simples des sites consensus de phosphorylation par la PKC ne modifient pas les propriétés biophysiques du canal ECaC-TRPV5

Le canal ECaC-TRPV5 et les mutants ont été exprimés dans les ovocytes de *Xenopus*. Les courants ont été mesurés avec la technique du voltage imposé à deux électrodes. Les courants macroscopiques ont été mesurés en condition témoin d'abord (120mM Li⁺, 0 Ca²⁺ libre, tracé en noir) et ensuite après l'addition de 1μM Ca²⁺ libre (tracé en bleu). Chaque tracé est la moyenne de "n" expériences normalisées par rapport au courant maximum obtenu en condition témoin, c'est à dire en absence complète d'ion Ca²⁺ libre. A: ECaC-sauvage, B: S144A (n=3), C: S298A (n=3), D: S654A (n=9), E: S664A (n=7), F: S698A (n=3).

III.1.2 PKA

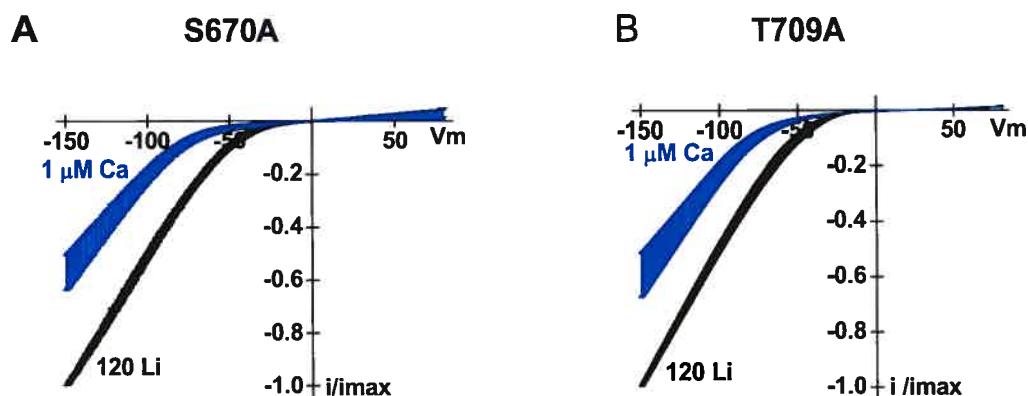
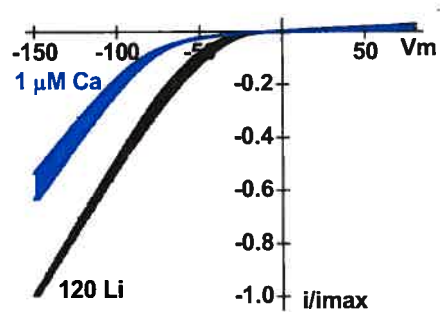


Figure 13 : Les mutations simples des sites consensus de phosphorylation par la PKA ne modifient pas les propriétés biophysiques du canal ECaC-TRPV5

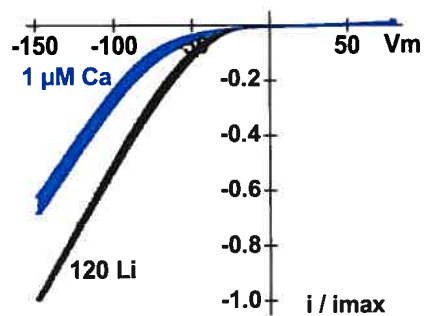
Le canal ECaC-TRPV5 et les mutants ont été exprimés dans les ovocytes de *Xenopus*. Les courants ont été mesurés avec la technique du voltage imposé à deux électrodes. Les courants macroscopiques ont été mesurés en condition témoin d'abord (120mM Li⁺, 0 Ca⁺² libre, tracé en noir) et ensuite après l'addition de 1μM Ca²⁺ libre (tracé en bleu). Chaque tracé est la moyenne de "n" expériences normalisées par rapport au courant maximum obtenu en condition témoin, c'est à dire en absence complète d'ion Ca²⁺ libre. A: S670A (n=3), B: T709A (n=3).

III.1.3 PKC : Mutations multiples

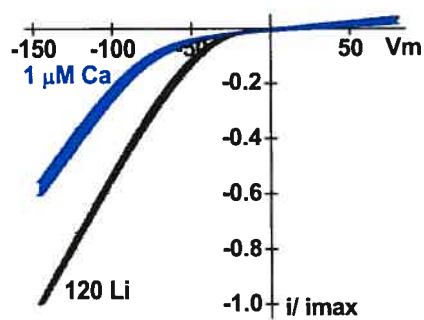
A S144A-S298A



B S144A-S298A-S654A



C S144A-S298A-S654A-S664A



D S144A-S298A-S654A-S664A-S698A

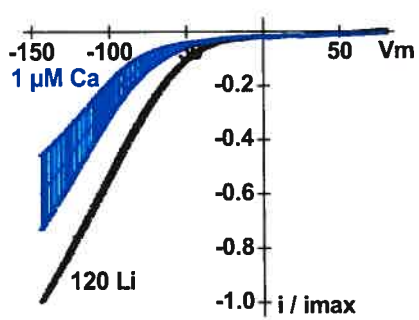


Figure 14 : Les mutations multiples des sites consensus de phosphorylation par la PKC ne modifient pas les propriétés biophysiques du canal ECaC-TRPV5

Le canal ECaC-TRPV5 et les mutants ont été exprimés dans les ovocytes de *Xenopus*. Les courants ont été mesurés avec la technique du voltage imposé à deux électrodes. Les courants macroscopiques ont été mesurés en condition témoin d'abord (120mM Li⁺, 0 Ca²⁺ libre, tracé en noir) et ensuite après l'addition de 1μM Ca²⁺ libre (tracé en bleu). Chaque tracé est la moyenne de "n" expériences normalisées par rapport au courant maximum obtenu en condition témoin, c'est à dire en absence complète d'ion Ca²⁺ libre. A: S144A-S298A (n=3), B: S144A-S298A-S654A (n=5), C: S144A-S298A-S654A-S664A (n=4), D: S144A-S298A-S654A-S664A-S698A (n=4).

Canaux TRPV5	Rectification entrante dans 120 Li ⁺	Courant (μA)	% du courant résiduel dans 1 μM Ca ²⁺
TRPV5 sauvage	Yes	-19 ± 2 (32) 0.46 ng RNA	35 ± 2 (3)
PKC - S144A	Yes	-32 ± 2 (3) 4.6 ng RNA	63 ± 3 (3)
PKC - S298A	Yes	-29 ± 5 (3) 4.6 ng RNA	54 ± 3 (3)
PKC - S654A	Yes	-17 ± 2 (9) 4.6 ng RNA	72 ± 11 (9)
PKC - S664A	Yes	-16 ± 3 (7) 4.6 ng RNA	66 ± 5 (7)
PKC - S698A	Yes	-15 ± 5 (3) 4.6 ng RNA	62 ± 6 (3)
S144A + S298A	Yes	-69 ± 12 (3) 4.6 ng RNA	58 ± 5 (3)
S144A + S298A + S654A	Yes	-45 ± 8 (5) 4.6 ng RNA	65 ± 3 (5)
S144A + S298A + S654A + S664A	Yes	-25 ± 4 (5) 4.6 ng RNA	58 ± 2 (4)
S144A + S298A + S654A + S664A + S698A	Yes	-21 ± 5 (4) 4.6 ng RNA	60 ± 14 (4)
PKA - S669A	Yes	-20 ± 3 (4) 4.6 ng RNA	60 ± 1 (3)
PKA - T709A	Yes	-16 ± 1 (3) 4.6 ng RNA	60 ± 3 (3)

Tableau I: Les propriétés biophysiques du canal ECaC-TRPV5 sauvage et muté en alanine (mutations simples et multiples) dans les ovocytes de *Xenopus*.

Tous les courants montrent une rectification entrante semblable au canal TRPV5 sauvage dans une solution exempte de cation divalent. Les courants ont été mesurés 24hrs après l'injection en présence d'une solution de Li⁺ (120 mM LiMeS + 5 mM EGTA + 0 Ca²⁺) à V_m = -150. La concentration de l'ARN injecté pour les mutants est 10 fois supérieure que celle utilisée pour le canal sauvage.

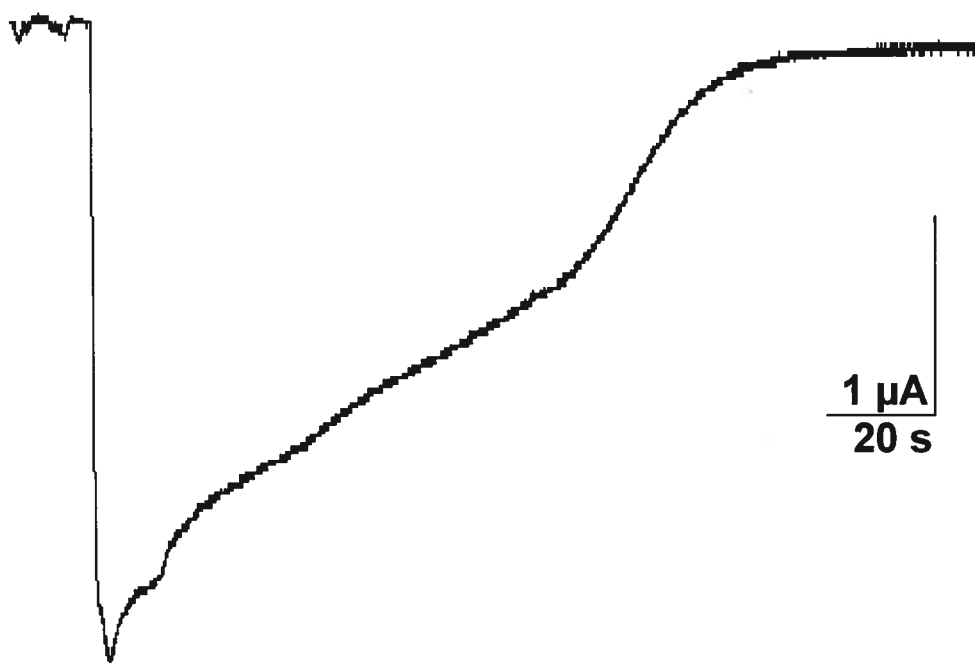
Le tableau I présente les valeurs absolues des courants mesurés pour chacun des mutants. Les résultats démontrent que le canal préserve la haute affinité pour le calcium. De plus, les données indiquent que les mutations simples et multiples des sites consensus de PKC et PKA ne changent pas l'expression fonctionnelle et les propriétés biophysiques du canal.

III.1.4 L'effet des mutations multiples sur la désensibilisation

Le canal ECaC-TRPV5 se désensibilise suite à l'ajout de calcium 10mM dans le bain. On observe un courant dès que le canal est exposé au calcium. Ce courant diminue en fonction du temps (figure 15A) et finit par disparaître totalement. Lorsque tous les sites de phosphorylation par la PKC sont mutés en alanine (figure 15B), le temps requis pour la désensibilisation est réduit énormément. En effet, après 10 secondes, le canal muté semble inactif tandis que le canal sauvage prend environ 2 minutes avant de se désensibiliser complètement. Après 5 secondes, le pourcentage du courant résiduel est de $32 \pm 5\%$ ($n=4$) pour le canal muté tandis qu'il est de $93 \pm 1\%$ ($n=4$) pour le canal sauvage. Ce résultat intéressant nous pourrait suggérer que la phosphorylation par la PKC semble jouer un rôle important dans la vitesse de désensibilisation induit par le calcium du canal ECaC-TRPV5.

La désensibilisation observée est un processus réversible. Après 20 minutes de perfusion avec une solution sans calcium + EGTA, on réussit à enregistrer des courants normaux (résultats non présentés).

A ECaC- Sauvage



B S144A-S298A-S654A-S664A-S698A

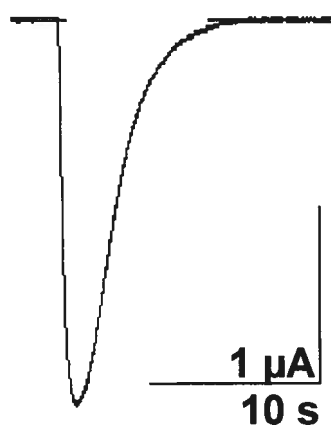


Figure 15 : Les mutations multiples des sites consensus de phosphorylation par la PKC diminuent le temps requis pour la désensibilisation du canal

Le canal ECaC-TRPV5 et les mutants ont été exprimés dans les ovocytes de *Xenopus*. Les courants ont été mesurés avec la technique du voltage imposé à deux électrodes. Les courants ont été enregistrés à -50mV , après l'ajout de la solution de lithium contenant du calcium 10mM . A: ECaC-Sauvage ($n=4$), B: S144A-S298A-S654A-S664A-S698A ($n=4$).

III.2 Les répétitions d'ankyrine

III.2.1 Délétion des répétitions d'ankyrine, études électrophysiologiques

Afin d'étudier l'implication des répétitions d'ankyrine dans l'expression de ECaC-TRPV5, les répétitions d'ankyrine ont été délétées dans la partie amino-terminale de la protéine. Des sites de digestion par l'enzyme de restriction *NheI* ont été créés aux extrémités de ce motif, ce qui a permis leur délétion séquentielle en préservant le cadre de lecture de la protéine. La première expérience visait (figure 17) à évaluer l'expression fonctionnelle du canal après les délétions des répétitions d'ankyrine. Les courants globaux de la cellule ont été mesurés après l'injection de l'ARNm codant pour le canal sauvage et le canal avec les différentes délétions d'ankyrine en présence de 120mM de Li^+ . Pour toutes les expériences, 5mM de EGTA est ajouté aux solutions salines pour éliminer tout le Ca^{2+} libre. Une série de rampes de potentiel est appliquée à partir d'un potentiel de maintien de -50mV (de $+80\text{mV}$ à -150mV) en absence de Ca^{2+} libre (Li^+ 120mM, Ca^{2+} 0mM, voir Mat&Méthodes). Chaque tracé est la moyenne d'au moins trois expériences effectuées sous les mêmes conditions et les courants ont été normalisés par rapport à la valeur maximum obtenue à -150mV . La délétion d'une seule répétition d'ankyrine ΔANK2 est suffisante pour empêcher toute expression fonctionnelle du canal ECaC-TRPV5 alors que, les courants entrants normaux ont été enregistrés pour le canal sauvage et ECaC 78-*NheI*, démontrant ainsi que la création des sites *NheI* n'affecte pas la fonction du canal. Ces observations nous amènent à conclure que les répétitions d'ankyrine semblent jouer un rôle dans l'expression fonctionnelle du canal ECaC-TRPV5.

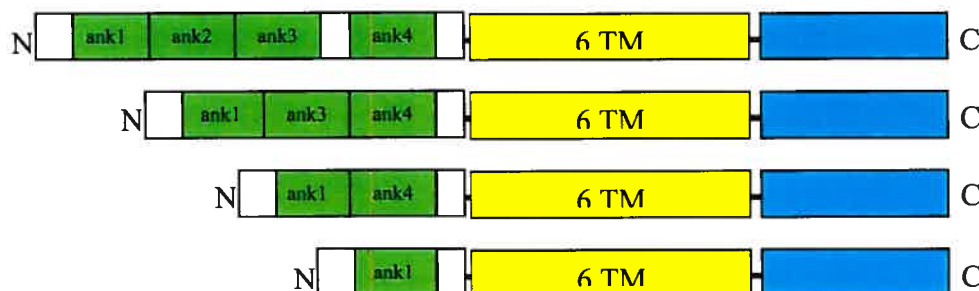


Figure 16 : La représentation schématique des constructions des délétions des répétitions d'ankyrine

Les constructions ECaC- Δ ANK2 (Δ 78-112), ECaC- Δ ANK2-3 (Δ 78-150), ECaC- Δ ANK2-4 (Δ 78-187) ont été réalisées sur pT7TS-ECaC et pCMVTag5-ECaC. Les répétitions d'ankyrine ont été enlevées séquentiellement sur chacun des vecteurs.

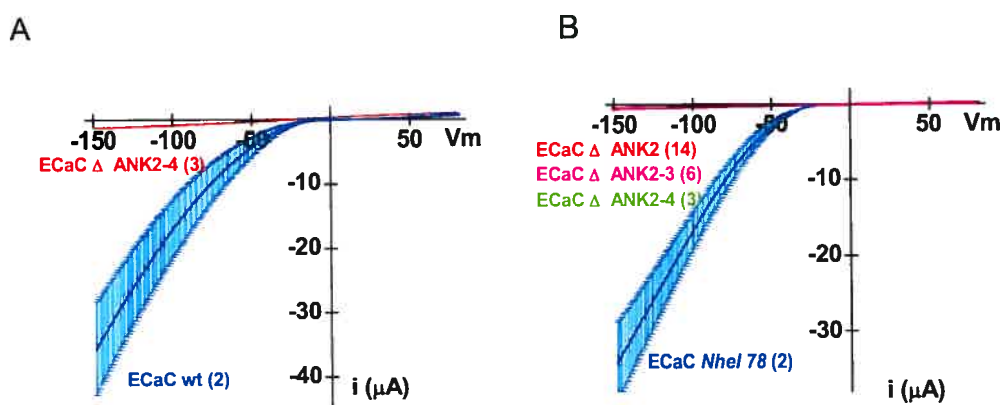


Figure 17 : Les délétions de répétitions d'ankyrine produisent des canaux non-fonctionnels.

Le canal ECaC-TRPV5 sauvage et les mutants Δ ANK ont été exprimés dans les ovocytes de *Xenopus* après l'injection d'ADN (A) ou d'ARN (B). Les courants ont été mesurés avec la technique deux-électrodes en présence de 120mM de Li^{2+} .

Canaux TRPV5	Rectification entrante dans 120 Li ⁺	Courants (μA)
TRPV5 wt (pT7TS)	Yes	-34 ± 2 (8) 0.46 ng RNA
Non-injected	No	-0.54 ± 0.06 (10) No RNA
Δ 78-112 Δ ANK 2	No	-0.55 ± 0.01 (4) 4.6 ng RNA
Δ 78-150 Δ ANK 2-3	No	-0.54 ± 0.03 (4) 4.6 ng RNA
Δ 78-187 Δ ANK 2-4	No	-0.6 ± 0.1 (7) 4.6 ng RNA

Tableau II: Les propriétés biophysiques du canal ECaC-TRPV5 sauvage et mutants ΔANK dans les ovocytes de *Xenopus*.

Le canal sauvage ECaC-TRPV5 montre une rectification entrante dans une solution exempte de cation divalent. Les courants ont été mesurés 24hrs après l'injection en présence d'une solution de Li⁺ (120 mM LiMeS + 5 mM EGTA + 0 Ca²⁺) à V_m = -150. La concentration de l'ARN injecté pour les mutants est 10 fois supérieure que celle utilisée pour le canal sauvage.

Le tableau II présente les courants mesurés pour le canal TRPV5 sauvage, les mutants ΔANK correspondant aux délétions des répétitions d'ankyrine et les œufs non-injectés. Les données indiquent que semblablement aux œufs non-injectés, les délétions des répétitions d'ankyrine ne génère pas de courant nous permettant ainsi de conclure que les délétions d'ankyrine conduisent à la formation des canaux non-fonctionnels.

III.2.2 Délétion des répétitions d'ankyrine, études d'immunobuvardage

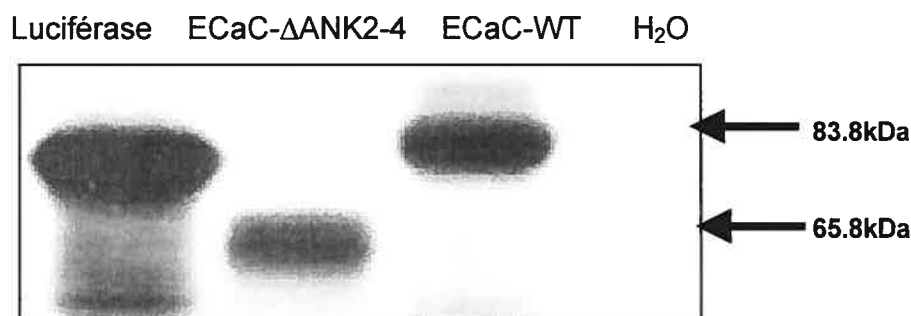


Figure 18 : Traduction *in vitro* de ECaC-ΔANK

Autoradiographie de ECaC-TRPV5 sauvage, ECaC-TRPV5 ΔANK2-4 et les contrôles (positif et négatif) après la traduction *in vitro*. Le canal ECaC-ΔANK2-4 a été traduit *in vitro* en utilisant un lysat de réticulocyte (voir Matériel et Méthodes). Les protéines traduites, marquées au méthionine-³⁵S, ont été séparées sur un gel d'acrylamide 7.5%. Le gel a été séché puis les protéines ont été détectées sur un film Kodak BioMax Light (BML).

Etant donné qu'aucun courant n'a été observé après délétion des répétitions d'ankyrine, nous avons voulu vérifier si le canal ECaC-TRPV5 était correctement traduit dans ces conditions. En effet, la queue amino-terminale d'une protéine est une région très importante qui peut être impliquée dans le contrôle de la transcription. Pour cette expérience contrôle, un lysat de réticulocytes de lapin a été utilisé. La figure 18 représente la traduction *in vitro* de ECaC-TRPV5 sauvage, ECaC-TRPV5 ΔANK2-4, la luciférase (témoin positif) et H₂O (témoin négatif). ECaC-TRPV5 sauvage est une protéine qui a un poids moléculaire d'environ 83.8 kDa. Dans le cas de ECaC-TRPV5 ΔANK2-4 (avec les trois délétions d'ankyrine), une bande de poids plus petit a été observée (puits #2, qui correspond au poids moléculaire estimé après la délétion de 109 aa) démontrant ainsi que le canal est bel et bien traduit suite aux délétions des répétitions d'ankyrine.

L'absence de courants n'est donc pas causée par une traduction incomplète de la protéine.

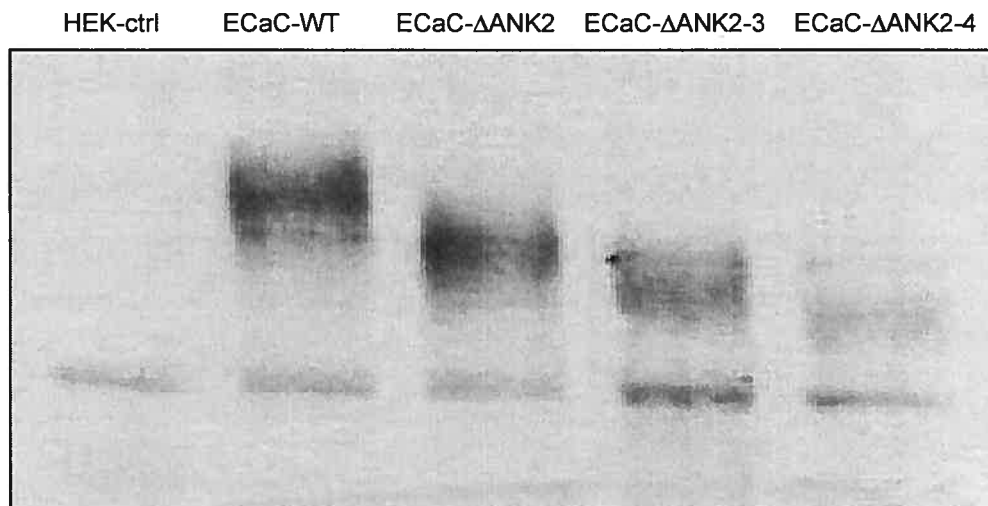


Figure 19 : L'expression membranaire de la protéine ECaC-TRPV5 diminue en fonction du nombre de répétitions d'ankyrine qui sont délétés

Autoradiographie d'immunobuvardage de type Western avec un anticorps anti-c-myc obtenu sur les préparations membranaires des cellules HEK-293 transfectées. Les protéines (10µg) ont été séparées sur gel d'acrylamide 7.5%. Le transfert des protéines est vérifié par révélation au rouge ponceau. La membrane de nitrocellulose a été bloquée toute la nuit à 4°C avec du lait écrémé 5%, puis incubée avec l'anticorps anti-c-myc (1/500) pendant 1 heure. La détection a été réalisée avec l'anticorps secondaire anti-souris-HRP.

L'expression membranaire de ECaC-ΔANK2, ECaC-ΔANK2-3, ECaC-ΔANK2-4 a été étudiée par immunobuvardage. Etant donné qu'il n'existe pas d'anticorps commercial spécifiquement dirigé contre le canal ECaC-TRPV5, ECaC-sauvage et les trois constructions ont été sous-clonées dans le vecteur pCMVTag5 qui contient un épitope c-myc, dans le C-terminal. Ce

vecteur contient deux origines de réplication qui permettent son expression dans les ovocytes de *Xenopus* (utile pour les mesures électrophysiologiques) et les cellules de mammifères (HEK-293). Les protéines membranaires (10µg pour chaque puit) ont été obtenues à partir des cellules HEK-293 transfectées de façon transitoire. La présence de la bande non spécifique au bas du gel nous indique que la même quantité de protéine a été chargée dans tous les puits. Les résultats obtenus dans la figure 19 montrent que la délétion des répétitions d'ankyrine n'empêche pas l'expression de la protéine à la membrane plasmique. Par contre on peut constater que le niveau d'expression du canal à la membrane diminue en fonction du nombre de répétitions d'ankyrine enlevé. En effet, lorsque trois répétitions d'ankyrine sont délétées, le canal n'est que faiblement exprimé à la membrane.

Il faudra rappeler que cette expérience a été effectuée avec des cellules HEK-293 mais nous avons réussi à reproduire ce résultat avec des ovocytes.

Il y a la présence d'une bande plus petite présente dans tous les puits. Il s'agit d'une bande non spécifique pour démontrer que la même quantité de protéine a été utilisée pour chaque puit car cette bande est de la même densité partout.

III.2.3 Études des interactions protéine-protéine par le système double-hybride

Afin d'identifier les partenaires cellulaires de ECaC-TRPV5, nous avons utilisé le système du double hybride chez la levure. Trois répétitions d'ankyrine ANK2-4 (la région 78-187) dans le N-terminal, ont été fusionnées au domaine GAL4 DNA-BD, un domaine de liaison à l'ADN, puis exprimées dans les levures. Ce domaine permet à la protéine de fusion de se lier à la région GAL-UAS dans le promoteur de gènes rapporteurs. Par la suite, nous avons co-exprimé (criblage) dans ces mêmes levures, des protéines issues

d'une banque d'ADNc préparée à partir de reins humains normaux (obtenu chez Clontech). Ces protéines quant à elles ont été fusionnées à un domaine de transactivation : le GAL4 AD. Lors d'une interaction entre les répétitions d'ankyrine (protéine appât) et une protéine de la banque (protéine proie), le domaine de la transactivation se trouve à proximité du gène rapporteur et peut ainsi en activer la transcription.

Afin d'effectuer un criblage par la méthode du double hybride, il est important que la protéine liée au domaine de liaison à l'ADN n'active pas indépendamment la transcription, c'est à dire qu'elle n'active pas la transcription des gènes rapporteurs sans interagir avec une protéine de la librairie. Nous avons donc testé si les trois répétitions d'ankyrine pouvaient activer la transcription de façon autonome. Le gène rapporteur *MEL1* code pour l'enzyme α -galactosidase, une enzyme qui est sécrétée dans le milieu. Cette enzyme catalyse l'hydrolyse de X- α -Gal en D-galactose et p-nitrophénol. Le produit p-nitrophénol, permet aux levures de devenir bleues à une longueur d'onde de 410nm. Nous avons donc transformé les levures avec les trois répétitions d'ankyrine et nous les avons cultivées sur un pétri contenant du X- α -Gal. Si les répétitions d'ankyrine activent la transcription de *MEL1*, les levures seront bleues. Le tableau I résume cette expérience : l'expression de ANK2-4-BD et de ANK2-4-AD dans les levures n'active pas la transcription, car les levures demeurent blanches, contrairement au contrôle positif (pGBKT7-53 + pTD1-1, fourni par Clontech) qui est bleu.

Vecteur	Couleur
PGBKT7-3ANK (DNA-BD)	Blanc
Pgadt7-3ANK (DNA-AD)	Blanc
PGBKT7-53 + pTD1-1 (Clontech) (contrôle positif)	Bleu

Tableau III : Activation indépendante de la transcription

Les vecteurs ont été transformés par la méthode d'acétate de lithium. Les levures ont été cultivées dans un incubateur à 30°C. Dans le système double-hybride, une interaction entre deux protéines active la transcription de gènes rapporteurs. Un de ces gènes (*MEL1*) hydrolyse X- α -Gal, les levures deviennent alors bleues. Les levures exprimant ANK2-4-BD ou ANK2-4-AD sont blanches, les répétitions d'ankyrines ne peuvent donc pas activer la transcription de façon autonome.

Par la suite, nous avons criblé une banque d'ADNc issue de reins humains normaux. Nous avons détecté plus de 300 clones interagissant potentiellement avec les répétitions d'ankyrine. Nous avons séquencé une trentaine de ces clones dont 5 codent pour des protéines inconnues (tableau II).

# Clone	#Accession	Identité en nucléotide
6	BC032456.1	272/274 (99%)
14	AY275537.1	194/196 (98%)
16	AC006254.10	190/192 (98%)
17	AK024018.1	163/164 (99%)
3	BC002945.2	234/241 (97%)

Tableau IV : Clones orphelins interagissant avec les répétitions d'ankyrine

5 des clones identifiés codent pour des protéines dont la fonction est encore inconnue. Le # d'accession permet l'accès rapide à leur séquence dans le Genbank. L'identité représente le nombre de nucléotides identiques entre nos séquences les séquences retrouvées dans Genbank.

Nous avons séquencé environ 300 bases et obtenu entre 97-100% d'identité avec les séquences retrouvées dans Genbank. Ceci confirme que

les plasmides codent pour des protéines encore inconnues. Les répétitions d'ankyrine interagissent avec des protéines dont la fonction est encore inconnue, il est donc important de vérifier régulièrement si la fonction de ces protéines n'aurait pas été élucidée.

11 de ces clones codent pour des protéines connues (tableau III). La traduction en protéine des séquences a été vérifiée sur le site www.infobiogen.fr. Selon les résultats obtenus, deux des ces protéines peuvent correctement être traduites : l'adenylate kinase et aminoacylase I. Ces deux protéines ont été séquencées au complet. Les 14 autres clones séquencés ne codent pas de protéines, ce sont soit des bouts de séquences non spécifiques ou bien des vecteurs vides.

# clones	Nom du gène	# accession	Identité en nucléotide
1	SLC7A8, LAT2	HSY184883	617/618 (99%)
4,5	Aminoacylase I	NM_000666.1	281/281 (100%)
7	Leukemia tumor antigen	NM_032869.2	155/155 (100%)
8	Adenosine déaminase	NM_015841.1	152/152 (100%)
9	Contactine 2 (axonal)	NM_005076.2	223/223 (100%)
13	Placental protein 6	NM_007024.3	183/183 (100%)
15	DAZAP2	NM_014764.1	174/174 (100%)
18	Ferritin light polypeptidase	NM_000146.2	192/192 (100%)
22	Adenylate Kinase	NM_000476	686/688 (99%)
26	Acyl-co desaturase	AF389338.1	192/192 (100%)

Tableau V: Clones connus interagissant avec les répétitions d'ankyrines

11 des clones identifiés codent pour des protéines dont la fonction est connue. Le # d'accession permet l'accès rapide à leur séquence dans le Genbank. L'identité représente le nombre de nucléotides identiques entre nos séquences les séquences retrouvées dans Genbank.

Etant donné que nous avons identifié deux protéines intéressantes qui interagissent avec les répétitions d'ankyrine, il est important de confirmer ces interactions initialement suggérées par le système double-hybride car il est possible d'avoir des faux positifs. En effet, il est toujours possible que les protéines identifiées activent la transcription des gènes rapporteurs indépendamment de leur interaction spécifique avec les répétitions d'ankyrine. Nous avons choisi de confirmer par la co-immunoprécipitation, les interactions entre les répétitions d'ankyrine et les deux protéines identifiées (aminoacylase I et adenylate kinase I). Cependant dans un premier temps il faudra vérifier par immunobuvardage si les protéines identifiées sont bel et bien traduites *in vivo* avec le bon poids moléculaire calculé théoriquement.



Figure 20 : Confirmation des interactions obtenues par le système double-hybride

Autoradiographie d'immunobuvardage de type Western-blot anti-HA obtenus sur des lysats des protéines des levures transformés avec chaque clone. Les protéines ont été séparées sur gel d'acrylamide de 18%. Le transfert des protéines est vérifié par révélation au rouge ponceau. La membrane de nitrocellulose a été bloquée toute la nuit à 4°C avec du lait écrémé 5%, puis incubée avec l'anticorps anti-HA-HRP (1/500) pendant 1 heure.

Les ADNc (les clones) sont clonés dans le vecteur d'expression pACT2, qui contient l'épitope HA et permet ainsi de détecter les protéines exprimées. La figure 20 démontre la traduction *in vivo* de l'aminocyclase I (clone 4) et l'adénylate kinase (clone 22). Une bande de poids moléculaire d'environ 30kDa a été détectée pour les deux clones analysés. Ce poids moléculaire obtenu est compatible avec le nombre de nucléotides séquencés pour chaque clone. Cependant, cette interaction n'est pas encore vérifiée par une co-immunoprécipitation. Cette dernière étant une technique très complexe, nous travaillons présentement sur la mise au point des conditions expérimentales (concentration des protéines, de l'anticorps, temps d'incubation etc.), ce qui nous permettra de réussir avec succès cette expérience.

III.2.4 Rôle des répétitions d'ankyrine dans la tétramérisation du canal calcique ECaC-TRPV5

Le ECaC-TRPV5 s'assemble en homotétramère afin de former un canal qui est fonctionnel. Les sous-unités α des canaux potassiques voltage dépendant forment des tétramères qui sont reliées par les domaines T1 des N-terminaux. Jusqu'à présent le domaine responsable de la tétramérisation de canal ECaC-TRPV5 n'a pas encore été élucidé. Nous avons voulu déterminer si les répétitions d'ankyrine se trouvant dans le N-terminal du canal pouvaient être impliquées dans la tétramérisation. Etant donné que le

canal s'assemble avec 4 sous-unités identiques, il doit avoir une interaction entre chaque sous-unité. Le système double-hybride a été utilisé afin de vérifier s'il y a homodimérisation entre les répétitions d'ankyrine c'est à dire si les répétitions d'ankyrine interagissent entre elles.

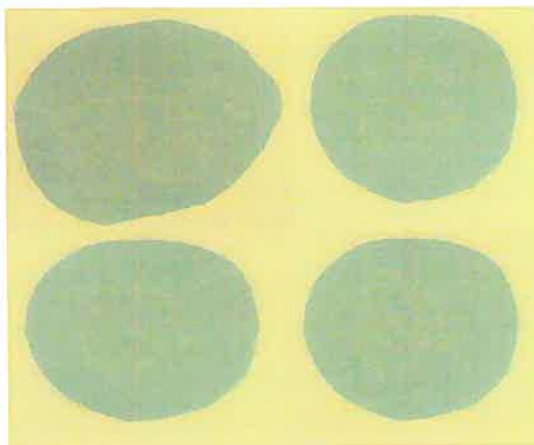


Figure 21 : Les répétitions d'ankyrine interagissent entre elles

L'activité β -galactosidase obtenue après la co-transformation de pGBKT7-ANK2-4(78-187) et pGADT7-ANK2-4(78-187) dans les levures AH109. Les levures ont été cultivées sur un milieu SD/-Trp/-Leu/-His contenant du X-gal (20mg/ml dissous dans du diméthylformamide). (voir Matériel et Méthodes)

Les trois répétitions d'ankyrine ont été clonées dans les vecteurs pGBKT7 (GAL4-BD) et pGADT7 (GAL4-AD) puis co-transformées dans les levures AH109 par la méthode d'acétate de lithium (LiAc). Les levures transformantes ont été cultivées sur un milieu contenant du X-gal et dépourvu en tryptophane, leucine et histidine. Lorsqu'il y a interaction, les gènes rapporteurs *HIS3* et *MEL1* sont transcrits. Ainsi les levures survivent dans un milieu dépourvu en histidine et deviennent bleues avec l'ajout de X-gal. C'est ce qui a été observé dans la figure 22, ce qui démontre que les répétitions d'ankyrine interagissent entre elles et forment des homodimères.

De ce fait, on peut supposer que les répétitions d'ankyrine peuvent être impliquées dans l'assemblage des sous-unités de ECaC-TRPV5.

IV DISCUSSION

Le canal calcique épithélial ECaC-TRPV5 est impliqué dans la réabsorption du calcium dans le tubule distal du rein. Le but principal de ce travail était d'approfondir les connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de ECaC-TRPV5 par la phosphorylation et par les interactions protéine-protéine. Pour ce faire, nous avons étudié dans un premier temps, par mutagenèse dirigée et par électrophysiologie, l'implication des sites consensus de phosphorylation par la PKA et la PKC dans la modulation de l'activité de canal ECaC-TRPV5. Ensuite, par des études de délétion d'ankyrine et d'immunobuvardage, le rôle des répétitions d'ankyrine dans l'expression de ECaC-TRPV5 a été étudié.

IV.1 La désensibilisation de ECaC-TRPV5 induit par le calcium implique les sites consensus de phosphorylation par la PKC.

ECaC-TRPV5 est un canal cationique qui a une très haute perméabilité pour les ions calciques mais il est également perméable aux cations monovalents en absence de cations divalents. [53, 57, 58] Le canal est constitutivement ouvert lorsqu'il est exprimé dans les cellules HEK-293 et les ovocytes de *Xenopus*. Nilius et ses collaborateurs [90] ont rapporté par des études électrophysiologiques en configuration « inside-out », que les niveaux de courants mesurés varient avec la concentration de calcium libre dans le bain ($[Ca^{2+}]_i$). Lorsque la concentration du calcium intracellulaire augmente, les courants observés sont moins élevés. Autrement dit, l'entrée du Ca^{2+} via ECaC-TRPV5 augmente la concentration du Ca^{2+} intracellulaire, ce qui conduit à la désensibilisation du canal. Ils ont ainsi conclu que l'activité de ECaC-TRPV5 est régulée par l'influx calcique à travers le canal. En effet, nous avons observé une désensibilisation du canal suite à l'ajout de calcium. La désensibilisation observée est un processus réversible sous nos conditions expérimentales. Après 20 minutes de perfusion avec une solution

sans calcium + EGTA, ont réussi à enregistrer des courants normaux (résultat non présenté). Étant donné nos conditions expérimentales, il est possible que la réserve d'ATP soit suffisante pour rephosphoryler le canal. Cette désensibilisation dépendant du Ca^{2+} peut être un mécanisme crucial pour la régulation de ECaC-TRPV5 en conditions physiologiques. Cependant, les mécanismes moléculaires responsables de la régulation du canal ECaC-TRPV5 dépendant du calcium ne sont pas connus.

Les canaux calciques dépendant du potentiel membranaire (Ca_v) de type L ($\text{Ca}_v1.2$) et P/Q ($\text{Ca}_v2.1$) sont aussi régulés par le niveau de Ca^{2+} intracellulaire. Cette modulation est médiée par la calmoduline (CaM). Cette protéine de type EF qui lie à Ca^{2+} est ubiquitaire chez les eucaryotes où elle participe à de nombreux processus cellulaires. Elle module l'activité de plusieurs canaux cationiques : elle déclenche l'inactivation des canaux perméables au Ca^{2+} et permet l'activation de certains canaux K_{Ca} . L'inactivation des canaux de type-L est très semblable à la désensibilisation observée dans le canal ECaC-TRPV5. La calmoduline contient quatre domaines de liaison au Ca^{2+} («*EF-hand structure*») repartis entre le N- et C-terminal. Lorsque la concentration intracellulaire de Ca^{2+} augmente, le calcium se lie à la calmoduline, qui à son tour se lie au domaine de liaison de la calmoduline des canaux. Cette liaison conduit à un changement conformationnel du canal, ce qui cause l'inactivation des canaux Ca_v . Un motif consensus de liaison de la calmoduline a été identifié au niveau de N- et C-terminal des canaux TRPV5 et TRPV6 [51, 52, 91]. Tout récemment l'équipe de Lamberts [92] a rapporté par la traduction *in vitro* et par la technique de «*GST-pull-down*» (GST-CaM) que les canaux TRPV5 et TRPV6 interagissent avec la calmoduline et la surexpression de la CaM mutée (un mutant dominant négatif de la calmoduline avec les quatre sites mutés, D20A + D56A + D93A + D129A, qui ne lie pas le calcium) diminue les courants mesurés en Ca^{2+} et Na^+ du canal TRPV6. Cette observation a été confirmée par des études de co-immunoprécipitation de TRPV6. En se

basant sur ces résultats, les chercheurs proposent que la CaM est probablement impliquée dans la régulation du canal TRPV6. Cependant, ils ont aussi démontré que la co-expression de la CaM muté avec le canal TRPV5 n'a aucun effet sur les courants mesurés. Des chimères ont été créées en échangeant la partie N- et/ou C-terminal du canal TRPV6 par celle(s) du canal TRPV5. La comparaison de l'amplitude des courants des différentes chimères suggère que la queue N-terminal du canal TRPV6 contribue à la régulation par le complexe calcium-calmoduline. Les auteurs ont ainsi conclu que même si la CaM se lie au canal ECaC-TRPV5, elle n'a aucun effet sur la régulation de ECaC-TRPV5. Il faudra souligner que la liaison de la CaM avec ECaC-TRPV5 n'a pas été confirmée par les expériences de co-immunoprecipitation car la traduction *in vitro* ne permet pas à la protéine d'acquies sa conformation native étant donné que les changements post-traductionnelles ne sont pas effectués. Mais il est quand même intéressant que la calmoduline puisse se lier au ECaC-TRPV5 et n'a aucun effet sur l'activité du canal. Nous avons aussi observé que la co-expression d'un mutant dominant négatif de la calmoduline n'a eu aucun effet sur l'activité du canal ECaC-TRPV5. (Bernatchez et al, non publié, 2000) Une observation similaire a été rapportée pour le canal $Ca_v2.3$ dont le C-terminal lie la CaM *in vitro* mais dont la fonction n'est pas modulée par la calmoduline.[93]

ECaC-TRPV5 contient dans sa structure primaire des sites consensus de phosphorylation par la PKA et la PKC. Étant donné que la CaM ne semble pas être impliquée dans la régulation du canal ECaC-TRPV5, nous avons étudié le rôle de la phosphorylation dans la désensibilisation du canal. Notre objectif était de vérifier si l'état de phosphorylation de la protéine était relié à la désensibilisation du canal. Dans un premier temps, des mutations en alanine ont été créées sur les résidus sérine correspondant aux sites consensus de phosphorylation par la PKC afin d'empêcher toute phosphorylation du canal. Étant donné que nous mesurons l'activité

fonctionnelle de ECaC-TRPV5 par électrophysiologie (par opposition à des mesures de protéines totales en immunoblots), l'absence de phosphorylation par la PKC de ECaC-TRPV5 aurait pu conduire à deux résultats expérimentaux. Soit que le canal déphosphorylé est inactif ou soit que le canal déphosphorylé montre des courants normaux avec une cinétique plus rapide de désensibilisation ou soit que ça n'a aucun effet.

Les résultats obtenus appuient la deuxième hypothèse. En effet lorsque tous les sites de phosphorylation sont mutés en alanine, le canal se désensibilise 12 fois plus rapidement que le canal sauvage. Étant donné que le canal ne pourra pas être phosphorylé, il passe donc moins de temps à l'état actif, de ce fait, on enregistre des courants plus petits. Dans nos expériences, nous mesurons des courants macroscopiques, il sera donc intéressant de faire les expériences en canal unitaire afin d'évaluer l'effet direct de la phosphorylation sur le canal. En se basant sur ces observations nous proposons que ECaC-TRPV5 est phosphorylé par la PKC à l'état initial et cette phosphorylation prévient la désensibilisation, c'est à dire qu'elle maintient le canal dans un état actif jusqu'à ce que l'augmentation du calcium intracellulaire via ECaC-TRPV5 conduise à la déphosphorylation des résidus sérine, ce qui désensibilise le canal. L'équipe de Bhawe [94] a obtenu des résultats similaires avec le canal TRPV1. Ils ont démontré que le canal TRPV1 (VR1) est activé par la PKA et cette phosphorylation empêche la désensibilisation du canal. Le canal TRPV1, le récepteur à la vanilloïde, est activé lorsqu'il est exposé à la capsaïcine. Les auteurs démontrent que cette activation est médiée par la PKA. Suite à l'incubation des cellules transfectées avec le TRPV1, par un analogue de l'AMPc, le 8Br-cAMP (l'AMPc est impliquée directement dans l'activation de la PKA) le canal TRPV1 devient actif. En effet, les auteurs démontrent que le canal non-phosphorylé n'est pas actif tandis que le canal phosphorylé est actif. Par des études de phosphorylation *in vitro* avec le marqueur radioactif ^{32}P , ils ont mis en évidence le rôle du résidu S116 dans la régulation de la désensibilisation

du canal TRPV1. La mutation S116A conduit à une désensibilisation plus rapide par rapport au canal sauvage. Étant donné que la désensibilisation de ECaC-TRPV5 implique les sites de phosphorylation, l'étape suivante sera d'identifier, quel(s) résidu(s) sont spécifiquement impliqués dans ce processus. Pour ce faire, chaque mutant alanine sera testé individuellement. Il faudra ensuite, évaluer le niveau de phosphorylation du canal avant et après les mutations par des expériences d'immunobuvardage. En effet, nous avons déjà fait un immunoblot de type Western avec un anticorps dirigé contre les résidus sérine phosphorylés (anti-phospho-sérine) de ECaC-TRPV5 pour voir si le canal est phosphorylé à l'état initial. Cependant, les résultats se sont avérés non concluants car l'anticorps utilisé n'était pas très spécifique. Nous avons récemment acheté un nouvel anticorps anti-phospho-sérine plus spécifique qui nous permettra de poursuivre nos expériences.

Si on analyse la figure 15 sans tenir compte des résultats obtenus par Jean et al. 2002, on voit que la phosphorylation modifie la désensibilisation du canal dépendant du calcium. Par contre si on compare avec les résultats obtenus par Jean et al. 2002, on suggère que la désensibilisation n'est pas influencée par la phosphorylation par la PKC. Étant donné que ce sont des résultats préliminaires, cette partie de la discussion demeure très spéculative. Nous voudrions répéter ces expériences avant de pouvoir arriver à une conclusion surtout que les vitesses de désensibilisation sont très dépendantes de la vitesse de perfusion.

Par la suite, l'implication des sites consensus de phosphorylation par la PKA dans le processus de désensibilisation sera aussi étudiée. En effet, la mutation en alanine des deux sites consensus de phosphorylation a déjà été effectuée et les propriétés biophysiques des mutants individuels sont testées (figure 13). Il reste à combiner les deux mutants et évaluer l'effet sur la désensibilisation.

Finalement, il faudra réaliser des mutations en aspartate des sites de phosphorylation. Le canal sera de cette façon dans un état constitutivement phosphorylé. Ainsi si notre hypothèse s'avère exacte, c'est-à-dire le canal fonctionnel est phosphorylé, le canal muté en aspartate restera dans un état constitutivement actif et ne se désensibilisera pas avec l'ajout de calcium. De cette façon on pourra affirmer que l'augmentation intracellulaire de calcium via ECaC-TRPV5 active des phosphatases dépendant du calcium (ex : calcineurine) qui à leur tour viennent déphosphoryler le canal, ce qui conduit au désensibilisation du canal.

IV.1.1 Implication de la calcineurine dans le processus de désensibilisation

Les phosphatases jouent un rôle important dans divers processus cellulaires. Ce sont des métaloenzymes qui catalysent la déphosphorylation de leur substrat en une étape. Les protéines phosphatases sont une famille composé de plusieurs classes (PP1, PP2A, PP2B, PP2C, PP4, PP5, PP6 et PP7) présentant un domaine de phosphatase commun et se distinguant de par leur spécificité aux substrats. Dans un article publié récemment, il est mis en évidence que proposent que la calcineurine [95] pourrait être impliquée dans la désensibilisation du canal TRPV1. Dans des études antérieures, il a été démontré que l'incubation de TRPV1 avec les inhibiteurs de la calcineurine réduit considérablement la désensibilisation. La protéine phosphatase IIB (calcineurine) est une protéine sérine/thréonine phosphatase activée par l'augmentation des niveaux de calcium intracellulaire. C'est une enzyme dimérique composée d'une sous-unité catalytique et d'une sous-unité régulatrice. La sous-unité catalytique est activée par la liaison du complexe $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. La calcineurine est présente dans le cerveau, dans tous les types de muscles et dans le rein [96]. En se basant sur ces données théoriques, nous proposons que la calcineurine pourrait être responsable de la déphosphorylation de la protéine ECaC-

TRPV5 suite à l'augmentation de calcium intracellulaire via le canal. Ce processus pourrait être déterminant dans le contrôle de l'homéostasie calcique dans les cellules épithéliales/rénales là où ECaC-TRPV5 est exprimé. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la calmoduline interagit avec le canal ECaC-TRPV5, (même si l'interaction reste à confirmer) mais n'a pas un effet direct sur la désensibilisation. Etant donné que la phosphatase calcineurine doit être liée au complexe Ca^{2+} -CaM pour être actif, l'interaction entre ECaC-TRPV5 et la calmoduline pourrait résulter de la liaison du complexe calcineurine- Ca^{2+} -CaM. Ce qui suggère que la calmoduline peut être indirectement impliquée dans la désensibilisation qui dépend du calcium. La déphosphorylation de la protéine-canal par la calcineurine- Ca^{2+} -CaM pourrait être initiée par la liaison de la calmoduline sur ECaC-TRPV5.

Il serait aussi intéressant de démontrer l'implication des phosphatases dans la désensibilisation du canal ECaC-TRPV5 à l'aide d'inhibiteurs des phosphatases qui sont perméables à travers la membrane cellulaire. Si notre hypothèse s'avère, la pré-incubation des cellules avec des inhibiteurs de phosphatases (l'acide okadaïque) devra prévenir la désensibilisation. Cet effet pourrait être observé aussi par la pré-incubation avec des agonistes de la PKC (TPA) qui produisent l'état phosphorylé.

IV.2 La délétion des répétitions d'ankyrine empêche l'expression fonctionnelle de ECaC-TRPV5

Dans la deuxième partie du projet, le rôle des répétitions d'ankyrine a été étudié. Les répétitions d'ankyrine sont présentes dans le N-terminal du canal ECaC-TRPV5. Très souvent les répétitions d'ankyrine sont impliquées dans les interactions protéine-protéine. Nous avons voulu déterminer le rôle des répétitions d'ankyrine dans l'activation de ECaC-TRPV5. La délétion de ANK2, ANK2-3 et ANK2-4 génèrent des canaux non-fonctionnels. La

délétion de ANK1 n'a pas été réalisée car jusqu'à tout récemment on pensait qu'il y avait seulement 3 répétitions d'ankyrine dans le N-terminal du canal. L'analyse de la séquence de la partie N-terminal à l'aide d'un programme informatique (www.scansite.com) nous a permis de constater la présence d'une autre ankyrine (ANK1) ce qui fait un total de quatre répétitions d'ankyrine. [97]

Nos résultats indiquent que ce motif dans le N-terminal du canal ECaC-TRPV5 est essentiel pour l'expression fonctionnelle du canal. Les études en immunobuvardage montrent une importante diminution de l'expression membranaire du canal après la délétion de ANK2-4. Nous avons essayé de démontrer ce résultat par immunofluorescence, par contre l'anticorps c-myc, utilisé pour les expériences immunologiques, n'étant pas très spécifique, les résultats se sont avérés non-concluants.

Nos résultats peuvent nous amener à l'hypothèse suivante : la délétion de ANK2-4 empêche l'homotétramérisation en créant des changements au niveau de la structure tertiaire de la protéine.

IV.3 Les répétitions d'ankyrine sont essentielles pour la tétramérisation de ECaC-TRPV5

Un article publié sur les canaux HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated*) [98] nous a conduit à faire l'expérience sur l'interaction des répétitions d'ankyrine avec le système de double hybride. Dans cette étude, l'équipe de Accilli a suggéré que le N-terminal de ce canal est important pour son assemblage et son expression fonctionnelle. Comme nous l'avons observé pour ECaC-TRPV5, la délétion d'une région conservée dans la partie N-terminale diminue considérablement les courants macroscopiques. Les auteurs proposent donc un rôle pour cette région dans l'assemblage des sous-unités et dans le ciblage vers la membrane

cytoplasmique. Des expériences effectuées en immunofluorescence ont en effet indiqué une diminution de la densité des canaux exprimés à la surface cellulaire suite à la délétion de la partie N-terminale. Le système double-hybride leur a permis de suggérer que la partie N-terminale de la protéine interagit avec elle-même.

Étant donné que les répétitions d'ankyrine sont situées dans la partie N-terminale du canal et qu'elles sont conservées dans les canaux de type TRPV, nous avons testé la même hypothèse dans le système double hybride avec le canal TRPV5. Les résultats obtenus démontrent que les répétitions d'ankyrine dans le N-terminal du canal calcique ECaC-TRPV5 interagissent ensemble. Par analogie avec les canaux ioniques à 6 segments TMs, on peut supposer que ECaC-TRPV5 est un canal qui est fonctionnel sous forme de tétramère donc les répétitions d'ankyrine pourraient être impliquées dans la tétramérisation. Le canal potassique de type Shaker est formé de quatre sous-unités α qui s'assemblent pour former une protéine-canal dans la membrane cytoplasmique. Le domaine T1 situé dans le N-terminal du canal Shaker est responsable de cet assemblage. Cette région qui permet la compatibilité des polypeptides pour l'assemblage du canal Shaker a été identifiée par des études de liaisons *in vitro* avec des chimères qui possèdent un N-terminal tronqué à différents endroits. [99] Il a été démontré que la délétion de ce domaine diminue considérablement l'expression fonctionnelle du canal, car après 44 heures, aucun courant n'est enregistré tandis qu'avec le canal sauvage on observe des courants seulement après 24 heures de l'injection de l'ARNm [100]. La co-injection d'un «domaine artificiel de tétramérisation» rétablit l'assemblage de canaux fonctionnels.

Jusqu'à présent aucune étude n'a été effectuée concernant l'assemblage des sous-unités de la protéine ECaC-TRPV5. Tout récemment l'équipe de Niemeyer [101] a analysé les queues N- et C-terminal afin de trouver la région responsable dans l'homotétramérisation du canal TRPV6.

Ils ont détecté que l'extrémité N-terminal («*full length*») interagit avec elle-même mais aucune interaction n'a été détectée au niveau du C-terminal. Étant donné que six répétitions d'ankyrines se trouvent au niveau du N-terminal de la protéine canal, ils ont mis l'accent sur l'étude de ce motif. Par la suite, la partie N-terminale a été divisée en petits fragments afin d'identifier la région minimale impliquée dans cette interaction. L'équipe de Niemeyer, a ainsi rapporté que l'ANK3 de TRPV6 est impliqué dans l'assemblage des sous-unités. En effet, ce groupe a démontré par des études de co-immunoprécipitation que la délétion de l'ANK3 diminue considérablement l'expression de TRPV6 et par le système double hybride chez la bactérie, ils ont démontré que seul ANK 3 est suffisant pour l'assemblage des sous-unités de TRPV6. Il a été mis en évidence dans notre laboratoire que le résidu D542 est impliqué dans la perméabilité du calcium [53] et la mutation D542A diminue les courants mesurés en calcium. La co-expression du canal muté (TRPV6-D542) avec le canal sauvage (TRPV6) diminue de moitié des courants normalement enregistrés avec le canal sauvage seul. Cette observation s'explique par l'assemblage des sous-unités du canal muté avec le canal sauvage pour former le canal tétramérique fonctionnel. Les chercheurs ont par la suite créé la délétion de ANK3 sur le canal TRPV6-D542A. La co-injection de TRPV6-D542A- Δ ANK3 avec le canal sauvage TRPV6 rétablit le niveau normal des courants car le canal muté (TRPV6-D542A) ne pourra plus s'assembler avec le canal sauvage à cause de la délétion de ANK3. Ce résultat confirme l'implication de ANK3 dans l'assemblage des sous-unités du canal TRPV6. Afin d'étudier la localisation de la protéine TRPV6 et TRPV6- Δ ANK3, des expériences de immunofluorescence ont été effectuées. À cause d'un signal fluorescent très élevé détecté au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi, le niveau d'expression n'a pas pu être évalué. Cependant, les expériences de biotinylation à la surface cellulaire montrent que le canal sauvage TRPV6 et TRPV6- Δ ANK3 sont tous les deux exprimés à la surface

cellulaire. Il serait intéressant de déterminer le niveau d'expression des protéines TRPV6 et TRPV6- Δ ANK3 et de quantifier le résultat.

Nous avons aussi fait des expériences de «rescue» en co-exprimant le canal TRPV5- Δ ANK (78-187) soit avec le CaT2 ou soit avec TRPV5-C556S en évaluant la sensibilité au MTSET. Les canaux CaT2 et TRPV5-C556S ne sont pas sensibles au MTSET. Lorsqu'il y a co-assemblage entre les monomères ECaC-TRPV5 et CaT2 (ou TRPV5-C556S) afin de former un canal tétramérique, on peut observer une sensibilité au MTSET. Cependant nous n'avons pas observé de changement avec la co-expression de CaT2 (ou TRPV5-C556S) et TRPV5- Δ ANK, il n'y avait pas de sensibilité au MTSET. Étant donné que les répétitions d'anhydrures étaient délétées, il n'y a sûrement pas eu de co-assemblage entre le CaT2 (ou TRPV5-C556S) et TRPV5- Δ ANK.

Toutes ces études et analyses appuient notre hypothèse de départ indiquant la possibilité que les répétitions d'anhydrure soient impliquées dans la tétramérisation.

Toutefois, de nombreuses erreurs/omission ont été relevées dans cet article. L'origine de la préparation des protéines n'est pas indiquée. En effet, les résultats peuvent varier énormément si on compare une préparation membranaire à une préparation de lysats totaux. Un autre problème est relevé au niveau de la taille des protéines. En effet, la taille de la protéine TRPV6 varie beaucoup d'une figure à une autre. Les auteurs expliquent cette différence par le processus de glycosylation. Il est vrai que la glycosylation change le poids moléculaire de la protéine mais il aurait fallu déterminer la taille de la protéine TRPV6 glycosylée (exprimée *in vivo*), la protéine TRPV6 non-glycosylée (*in vitro*) et la taille théorique des délétions et par la suite commenter les résultats. La glycosylation étant une modification post-traductionnelle, elle n'est pas effectuée lorsqu'on exprime la protéine *in*

vitro. Alors on obtient une bande de taille moins élevée par rapport à la protéine traduite dans les cellules.

Des études antérieures ont montré que les canaux de la même famille peuvent se co-assembler. En 2003, le laboratoire du Bindels [52] a montré par des études de co-immunoprécipitation, que les canaux calciques épithéliaux TRPV5 et TRPV6 forment des homotétramères et des hétérotétramères lorsqu'ils sont exprimés seul ou ensemble dans les ovocytes de *Xenopus*. Donc étant donné que ces canaux peuvent former des hétérotétramères et que l'ANK3 est impliqué dans l'assemblage des sous-unités de TRPV6, cette ankyrine est sûrement importante pour la tétramérisation de ECaC-TRPV5 aussi.

Des analyses de séquences d'acides aminés démontrent que le canal ECaC-TRPV5 présente un haut pourcentage d'homologie avec le canal TRPV6 au niveau des répétitions d'ankyrine 2,3 et 4.

V5-ANK1 RDSPL LQA AKENDLRLLKILL NQSCDFQQR
V6-ANK1 IWESPL LLA AKDNDVQALNK LLKYEDCKVHQ

V5-ANK2 VGETALHVAALYDNLEAATLLMEAAPELAKE
V6-ANK2 MGETALHIAALYDNLEAAMVLMEAAPELVFE

V5-ANK3 VGQTALHIAVMNQNLNLVRALLARGASVSAR
V6-ANK3 EGQTALHIAVVNQNMNLVRALLARRASVSAR

V5-ANK4 YGEHPLSFAACVGVSEEIVRLLIEHGADIRAQ
V6-ANK4 FGEHPLSFAACVNSEEIVRLLIEHGADIRAQ

Dans nos résultats, nous avons démontré que la délétion de ANK2-4, ANK2-3 et même que la seule délétion de ANK2 de ECaC-TRPV5 (figure 19) abolit

les courants mesurés. Nous proposons ainsi que l'ANK2 de ECaC-TRPV5 est aussi importante pour l'assemblage des sous-unités du canal ou le repliement correct de la protéine.

Nous avons essayé de confirmer l'interaction entre les répétitions d'ankyrine de ECaC-TRPV5 (homodimérisation) par des expériences *in vitro*. Les répétitions d'ankyrine (ANK2-4) ont été traduites *in vitro* avec le marqueur ^{35}S -méthionine et ont été incubées avec les préparations de protéines de ECaC-TRPV5 sauvage et ECaC-TRPV5- Δ ANK2-4 transférées sur une membrane de nitrocellulose. On s'attendait à obtenir une bande au niveau de ECaC-TRPV5 sauvage et aucune bande pour ECaC-TRPV5- Δ ANK2-4 étant donné que les répétitions d'ankyrine sont délétées. Par contre nos résultats se sont avérés non-concluants car contrairement aux motifs de type SH2 dont l'interaction s'effectue au niveau de la structure primaire, l'interaction avec les répétitions d'ankyrine est réalisée au niveau de la structure tertiaire de la protéine. Étant donné que la traduction *in vitro* ne permet pas à la protéine d'acquies sa structure tertiaire, cette interaction ne pourra pas être réalisée.

IV.4 Protéines qui interagissent avec le canal ECaC-TRPV5

Nous avons identifié par la méthode double-hybride, plusieurs protéines capables d'interagir avec le canal ECaC-TRPV5 via les répétitions d'ankyrines (tableaux II et III) et nous avons confirmé certaines de ces interactions par immunobuvardage (figure 20). Par contre, l'interprétation de ces résultats est compliquée. Il faudra rappeler que le séquençage des clones continue car il reste encore environ 270 clones non-identifiés qui peuvent coder pour des protéines d'intérêt physiologique. Nous n'avons proposé aucune hypothèse en qui concerne des deux protéines (aminoacylase I et adénylate kinase I). L'aminoacylase I est une métalloenzyme homodimérique qui est impliquée dans l'hydrolyse des acides

aminés N-acétylés ou N-acylés. C'est une des enzymes les plus abondantes dans la région corticale du rein. Alors nous pensons que cette protéine intervient probablement lors des modifications post-traductionnelles de ECaC-TRPV5 afin de permettre au canal d'acquérir sa conformation native. En effet, plusieurs canaux contiennent des sites consensus de N-acétylation dans régions cytoplasmiques. Il a été démontré par des études de traduction *in vitro* en présence de [^3H]acetyl-CoA, que le canal potassique $\text{K}_{\text{ir}} 2.1$ est acétylé [102]. Les auteurs proposent que ce processus permet possiblement à la protéine de former une structure fonctionnelle au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique avant son insertion dans la membrane cytoplasmique.

En ce qui concerne l'adénylate kinase, cette enzyme catalyse la transformation de l'ATP en ADP, [103] ce qui permet aux canaux K_{ATP} de s'ouvrir.[104] Nous ne savons pas encore quel est le rôle de l'interaction de l'adénylate kinase avec ECaC-TRPV5 sur la fonction du canal. Nous ne savons pas si la présence d'ATP joue un rôle dans l'activation du canal ECaC-TRPV5. Alors, en se basant sur l'article de Brochiero E. et al, 2000, [104] nous avons incubé les œufs injectés avec le canal ECaC-TRPV5, avec l'acide iodoacétique (5mM) qui inhibe la glycolyse. Cependant les résultats obtenus n'ont pas été concluants mais il sera intéressant de refaire en variant la concentration et le temps d'incubation avec l'acide iodoacétique.

En fait, nous nous attendions à identifier des protéines de cytosquelette interagissant avec les répétitions d'ankyrine de ECaC-TRPV5 car l'ankyrine pourrait constituer un lieu d'ancrage du canal ECaC-TRPV5 au cytosquelette. Nous souhaitons trouver une des protéines composantes du cytosquelette lors du séquençage des clones restants.

V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'entrée du calcium à l'intérieur des cellules épithéliales de différents tissus se fait surtout à travers les canaux de type TRP tel que le canal calcique ECaC-TRPV5. Le rôle de ce canal calcique épithélial est de permettre la réabsorption du calcium dans les cellules polarisées du tubule distal de rein, réabsorption qui se fait selon un processus transcellulaire. La régulation fine de réabsorption du calcium est sous l'influence d'hormones dont la vitamine D₃, la calcitonine et la PTH, au niveau du tubule distal. Nous avons déjà essayé de caractériser la régulation du canal ECaC-TRPV5 par la PTH (durant mon projet de stage). L'influx calcique a été mesuré sur des cellules en culture exprimant ECaC-TRPV5 seul et a été comparé aux réponses calciques obtenues sur les cellules stables hPTHr-ECaC-TRPV5 après la stimulation par la PTH. Les réponses obtenues avant et après la stimulation par la PTH n'ont pas montré une grande différence, nous n'avons donc pas pu apporter une conclusion.

Le principal objectif du présent travail de recherche consistait à caractériser au niveau moléculaire la régulation du canal calcique ECaC-TRPV5 par la phosphorylation et par des interactions protéines-protéines avec les répétitions d'ankyrine.

Nos résultats obtenus suite à la caractérisation électrophysiologique du canal calcique épithélial ECaC-TRPV5 dont tous les sites consensus de phosphorylation par la PKC sont mutés en alanine, indiquent que l'état phosphorylé de la protéine-canal est impliqué dans le processus de désensibilisation. En effet, nous avons proposé que le canal ECaC-TRPV5 est constitutivement phosphorylé par la PKC dans les systèmes hétérologues et l'influx calcique déclenche l'activation des phosphatases endogènes.

Les expériences effectuées en immunobuvardage démontrent que la délétion des répétitions d'ankyrine diminue l'expression membranaire du canal et la délétion de ANK2 est suffisante pour inhiber l'expression fonctionnelle du canal. Finalement, nous avons démontré avec le système double hybride dans la levure, que les répétitions d'ankyrine du canal ECaC-TRPV5 interagissent ensemble, ce qui suggère qu'elles pourraient jouer un rôle dans l'homotétramérisation.

Dans les expériences ultérieures, nous voudrions déterminer laquelle des répétitions d'ankyrine est spécifiquement impliquée dans l'assemblage des sous-unité. L'ANK3 est responsable de la homotétramérisation du canal TRPV6, cependant, nous pensons que l'ANK2 du canal TRPV5 est aussi importante pour l'association des monomères.

L'étude sur la modulation du canal ECaC-TRPV5 pourrait permettre de faire la lumière sur certains désordres liés à l'homéostasie calcique, tels que l'hypercalciurie idiopathique, l'ostéoporose et la malabsorption calcique liée à l'âge. Plusieurs interrogations à propos du canal calcique ECaC-TRPV5 demeurent toujours sans réponse. De futures analyses sur le canal vont certainement permettre une meilleure compréhension de l'homéostasie calcique chez les mammifères et ainsi cibler les approches pharmacologiques qui permettront de corriger les désordres rénaux de la réabsorption calcique.

VI. BIBLIOGRAPHIE

1. Bowers, G.N., Jr., C. Brassard, and S.F. Sena, *Measurement of ionized calcium in serum with ion-selective electrodes: a mature technology that can meet the daily service needs*. Clin Chem, 1986. **32**(8): p. 1437-47.
2. Friedman, P.A. and F.A. Gesek, *Calcium transport in renal epithelial cells*. Am J Physiol, 1993. **264**(2 Pt 2): p. F181-98.
3. Rasmussen, H. and P.Q. Barrett, *Calcium messenger system: an integrated view*. Physiol Rev, 1984. **64**(3): p. 938-84.
4. Heaney, R.P., et al., *Calcium nutrition and bone health in the elderly*. Am J Clin Nutr, 1982. **36**(5 Suppl): p. 986-1013.
5. Ammann, P., R. Rizzoli, and H. Fleisch, *Calcium absorption in rat large intestine in vivo: availability of dietary calcium*. Am J Physiol, 1986. **251**(1 Pt 1): p. G14-8.
6. Poujeol, P., M. Bidet, and M. Tauc, *Calcium transport in rabbit distal cells*. Kidney Int, 1995. **48**(4): p. 1102-10.
7. Ng, R.C., D. Rouse, and W.N. Suki, *Calcium transport in the rabbit superficial proximal convoluted tubule*. J Clin Invest, 1984. **74**(3): p. 834-42.
8. Friedman, P.A., *Basal and hormone-activated calcium absorption in mouse renal thick ascending limbs*. Am J Physiol, 1988. **254**(1 Pt 2): p. F62-70.
9. Hoenderop, J.G., P.H. Willems, and R.J. Bindels, *Toward a comprehensive molecular model of active calcium reabsorption*. Am J Physiol Renal Physiol, 2000. **278**(3): p. F352-60.
10. Hoenderop, J.G., B. Nilius, and R.J. Bindels, *Molecular mechanism of active Ca^{2+} reabsorption in the distal nephron*. Annu Rev Physiol, 2002. **64**: p. 529-49.
11. Hoenderop, J.G., et al., *Calcitriol controls the epithelial calcium channel in kidney*. J Am Soc Nephrol, 2001. **12**(7): p. 1342-9.
12. Borke, J.L., et al., *Plasma membrane calcium pump and 28-kDa calcium binding protein in cells of rat kidney distal tubules*. Am J Physiol, 1989. **257**(5 Pt 2): p. F842-9.
13. Feher, J.J., C.S. Fullmer, and R.H. Wasserman, *Role of facilitated diffusion of calcium by calbindin in intestinal calcium absorption*. Am J Physiol, 1992. **262**(2 Pt 1): p. C517-26.
14. Gross, M. and R. Kumar, *Physiology and biochemistry of vitamin D-dependent calcium binding proteins*. Am J Physiol, 1990. **259**(2 Pt 2): p. F195-209.
15. Diepens, R.J., et al., *Characterization of a murine renal distal convoluted tubule cell line for the study of transcellular calcium transport*. Am J Physiol Renal Physiol, 2004. **286**(3): p. F483-9.
16. D'Souza-Li, L., et al., *Identification and functional characterization of novel calcium-sensing receptor mutations in familial hypocalciuric hypercalcemia and autosomal dominant hypocalcemia*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(3): p. 1309-18.

17. Silver, J., S.B. Sela, and T. Naveh-Many, *Regulation of parathyroid cell proliferation*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 1997. **6**(4): p. 321-6.
18. Bourdeau, J.E. and M.B. Burg, *Effect of PTH on calcium transport across the cortical thick ascending limb of Henle's loop*. *Am J Physiol*, 1980. **239**(2): p. F121-6.
19. Costanzo, L.S. and E.E. Windhager, *Effects of PTH, ADH, and cyclic AMP on distal tubular Ca and Na reabsorption*. *Am J Physiol*, 1980. **239**(5): p. F478-85.
20. Costanzo, L.S. and E.E. Windhager, *Effects of parathyroid hormone and cyclic AMP on distal tubular calcium and sodium transport*. *Contrib Nephrol*, 1980. **20**: p. 114-7.
21. Shimizu, T., et al., *Effects of PTH, calcitonin, and cAMP on calcium transport in rabbit distal nephron segments*. *Am J Physiol*, 1990. **259**(3 Pt 2): p. F408-14.
22. Pfister, M.F., et al., *Parathyroid hormone leads to the lysosomal degradation of the renal type II Na/Pi cotransporter*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(4): p. 1909-14.
23. Garabedian, M., et al., *Control of 25-hydroxycholecalciferol metabolism by parathyroid glands*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1972. **69**(7): p. 1673-6.
24. Chen, C.J., et al., *Divalent cations suppress 3',5'-adenosine monophosphate accumulation by stimulating a pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding protein in cultured bovine parathyroid cells*. *Endocrinology*, 1989. **124**(1): p. 233-9.
25. Blair, H.C., *How the osteoclast degrades bone*. *Bioessays*, 1998. **20**(10): p. 837-46.
26. Murrills, R.J., et al., *The effects of parathyroid hormone (PTH) and PTH-related peptide on osteoclast resorption of bone slices in vitro: an analysis of pit size and the resorption focus*. *Endocrinology*, 1990. **127**(6): p. 2648-53.
27. Partridge, N.C., S.R. Bloch, and A.T. Pearman, *Signal transduction pathways mediating parathyroid hormone regulation of osteoblastic gene expression*. *J Cell Biochem*, 1994. **55**(3): p. 321-7.
28. Simon, L.S., et al., *Changes in serum levels of type I and III procollagen extension peptides during infusion of human parathyroid hormone fragment (1-34)*. *J Bone Miner Res*, 1988. **3**(2): p. 241-6.
29. Horwood, N.J., et al., *Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells*. *Endocrinology*, 1998. **139**(11): p. 4743-6.
30. Slatopolsky, E., et al., *Marked suppression of secondary hyperparathyroidism by intravenous administration of 1,25-dihydroxycholecalciferol in uremic patients*. *J Clin Invest*, 1984. **74**(6): p. 2136-43.
31. Beckerman, P. and J. Silver, *Vitamin D and the parathyroid*. *Am J Med Sci*, 1999. **317**(6): p. 363-9.
32. Demay, M.B., et al., *Sequences in the human parathyroid hormone gene that bind the 1,25-dihydroxyvitamin D₃ receptor and mediate transcriptional repression in response to 1,25-dihydroxyvitamin D₃*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(17): p. 8097-101.

33. Kronenberg, H.M., et al., *Structure and expression of the human parathyroid hormone gene*. Recent Prog Horm Res, 1986. **42**: p. 641-63.
34. Hoenderop, J.G., et al., *Molecular identification of the apical Ca^{2+} channel in 1, 25-dihydroxyvitamin D3-responsive epithelia*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8375-8.
35. Weber, K., et al., *Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(5): p. 1287-94.
36. Ruat, M., et al., *Calcium sensing receptor: molecular cloning in rat and localization to nerve terminals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(8): p. 3161-5.
37. Chakraborty, M., et al., *Cell cycle-dependent and kinase-specific regulation of the apical Na/H exchanger and the Na,K-ATPase in the kidney cell line LLC-PK1 by calcitonin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(6): p. 2115-9.
38. Chabre, O., et al., *A recombinant calcitonin receptor independently stimulates 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and Ca^{2+} /inositol phosphate signaling pathways*. Mol Endocrinol, 1992. **6**(4): p. 551-6.
39. Chambers, T.J. and A. Moore, *The sensitivity of isolated osteoclasts to morphological transformation by calcitonin*. J Clin Endocrinol Metab, 1983. **57**(4): p. 819-24.
40. Hoenderop, J.G., B. Nilius, and R.J. Bindels, *ECaC: the gatekeeper of transepithelial Ca^{2+} transport*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1600**(1-2): p. 6-11.
41. Birnbaumer, L., E. Yildirim, and J. Abramowitz, *A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives*. Cell Calcium, 2003. **33**(5-6): p. 419-32.
42. Clapham, D.E., L.W. Runnels, and C. Strubing, *The TRP ion channel family*. Nat Rev Neurosci, 2001. **2**(6): p. 387-96.
43. Montell, C., *Physiology, phylogeny, and functions of the TRP superfamily of cation channels*. Sci STKE, 2001. **2001**(90): p. RE1.
44. Montell, C., et al., *A unified nomenclature for the superfamily of TRP cation channels*. Mol Cell, 2002. **9**(2): p. 229-31.
45. Montell, C., *Molecular genetics of Drosophila TRP channels*. Novartis Found Symp, 2004. **258**: p. 3-12; discussion 12-7, 98-102, 263-6.
46. Clapham, D.E., *Signal transduction. Hot and cold TRP ion channels*. Science, 2002. **295**(5563): p. 2228-9.
47. Montell, C., L. Birnbaumer, and V. Flockerzi, *The TRP channels, a remarkably functional family*. Cell, 2002. **108**(5): p. 595-8.
48. Caterina, M.J. and D. Julius, *The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway*. Annu Rev Neurosci, 2001. **24**: p. 487-517.
49. Van Cromphaut, S.J., et al., *Duodenal calcium absorption in vitamin D receptor-knockout mice: functional and molecular aspects*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13324-9.
50. Li, Y.C., et al., *Effects of vitamin D receptor inactivation on the expression of calbindins and calcium metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2001. **281**(3): p. E558-64.

51. Hoenderop, J.G., B. Nilius, and R.J. Bindels, *Epithelial calcium channels: from identification to function and regulation*. Pflugers Arch, 2003. **446**(3): p. 304-8.
52. Hoenderop, J.G., et al., *Homo- and heterotetrameric architecture of the epithelial Ca^{2+} channels TRPV5 and TRPV6*. Embo J, 2003. **22**(4): p. 776-85.
53. Jean, K., et al., *Role of aspartate residues in Ca^{2+} affinity and permeation of the distal ECaC1*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(4): p. C665-72.
54. Stauffer, D.A. and A. Karlin, *Electrostatic potential of the acetylcholine binding sites in the nicotinic receptor probed by reactions of binding-site cysteines with charged methanethiosulfonates*. Biochemistry, 1994. **33**(22): p. 6840-9.
55. Simoes, M., et al., *Cysteine mutagenesis and computer modeling of the S6 region of an intermediate conductance IKCa channel*. J Gen Physiol, 2002. **120**(1): p. 99-116.
56. Dodier, Y., et al., *Outer pore topology of the ECaC-TRPV5 channel by cysteine scan mutagenesis*. J Biol Chem, 2004. **279**(8): p. 6853-62.
57. Vennekens, R., et al., *Permeation and gating properties of the novel epithelial Ca^{2+} channel*. J Biol Chem, 2000. **275**(6): p. 3963-9.
58. Nilius, B., et al., *Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca^{2+} channel ECaC*. J Physiol, 2000. **527 Pt 2**: p. 239-48.
59. Levitan, I.B., *Modulation of ion channels by protein phosphorylation and dephosphorylation*. Annu Rev Physiol, 1994. **56**: p. 193-212.
60. Jonas, E.A. and L.K. Kaczmarek, *Regulation of potassium channels by protein kinases*. Curr Opin Neurobiol, 1996. **6**(3): p. 318-23.
61. Swartz, K.J., *Modulation of Ca^{2+} channels by protein kinase C in rat central and peripheral neurons: disruption of G protein-mediated inhibition*. Neuron, 1993. **11**(2): p. 305-20.
62. Swartz, K.J., et al., *Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca^{2+} channels and synaptic transmission*. Nature, 1993. **361**(6408): p. 165-8.
63. Bourinet, E., et al., *Protein kinase C regulation of cardiac calcium channels expressed in *Xenopus* oocytes*. Pflugers Arch, 1992. **421**(2-3): p. 247-55.
64. Bourinet, E., et al., *Endogenous *Xenopus*-oocyte Ca-channels are regulated by protein kinases A and C*. FEBS Lett, 1992. **299**(1): p. 5-9.
65. Lory, P. and J. Nargeot, *Cyclic AMP-dependent modulation of cardiac Ca channels expressed in *Xenopus laevis* oocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1992. **182**(3): p. 1059-65.
66. Sculptoreanu, A., T. Scheuer, and W.A. Catterall, *Voltage-dependent potentiation of L-type Ca^{2+} channels due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase*. Nature, 1993. **364**(6434): p. 240-3.
67. Sculptoreanu, A., et al., *Voltage-dependent potentiation of the activity of cardiac L-type calcium channel alpha 1 subunits due to phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10135-9.

68. Lux, S.E., K.M. John, and V. Bennett, *Analysis of cDNA for human erythrocyte ankyrin indicates a repeated structure with homology to tissue-differentiation and cell-cycle control proteins*. *Nature*, 1990. **344**(6261): p. 36-42.
69. Breeden, L. and K. Nasmyth, *Similarity between cell-cycle genes of budding yeast and fission yeast and the Notch gene of Drosophila*. *Nature*, 1987. **329**(6140): p. 651-4.
70. Breeden, L. and K. Nasmyth, *Cell cycle control of the yeast HO gene: cis- and trans-acting regulators*. *Cell*, 1987. **48**(3): p. 389-97.
71. Rubtsov, A.M. and O.D. Lopina, *Ankyrins*. *FEBS Lett*, 2000. **482**(1-2): p. 1-5.
72. Michaely, P. and V. Bennett, *Mechanism for binding site diversity on ankyrin. Comparison of binding sites on ankyrin for neurofascin and the Cl-/HCO3- anion exchanger*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(52): p. 31298-302.
73. Michaely, P. and V. Bennett, *The ANK repeat: a ubiquitous motif involved in macromolecular recognition*. *Trends Cell Biol*, 1992. **2**(5): p. 127-9.
74. Bouzidi, M., et al., *Interaction of the Nav1.2a subunit of the voltage-dependent sodium channel with nodal ankyrinG. In vitro mapping of the interacting domains and association in synaptosomes*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(32): p. 28996-9004.
75. Malhotra, J.D., et al., *Structural requirements for interaction of sodium channel beta 1 subunits with ankyrin*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(29): p. 26681-8.
76. Batrukova, M.A., et al., *Ankyrin: structure, properties, and functions*. *Biochemistry (Mosc)*, 2000. **65**(4): p. 395-408.
77. Bork, P., *Hundreds of ankyrin-like repeats in functionally diverse proteins: mobile modules that cross phyla horizontally?* *Proteins*, 1993. **17**(4): p. 363-74.
78. Bourguignon, L.Y., et al., *The involvement of ankyrin in the regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-mediated internal Ca²⁺ release from Ca²⁺ storage vesicles in mouse T-lymphoma cells*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(10): p. 7290-7.
79. Bourguignon, L.Y., et al., *Ryanodine receptor-ankyrin interaction regulates internal Ca²⁺ release in mouse T-lymphoma cells*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(30): p. 17917-22.
80. Bourguignon, L.Y. and H. Jin, *Identification of the ankyrin-binding domain of the mouse T-lymphoma cell inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor and its role in the regulation of IP3-mediated internal Ca²⁺ release*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(13): p. 7257-60.
81. Minke, B. and B. Cook, *TRP channel proteins and signal transduction*. *Physiol Rev*, 2002. **82**(2): p. 429-72.
82. Chien, C.T., et al., *The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(21): p. 9578-82.
83. Fields, S. and O. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. *Nature*, 1989. **340**(6230): p. 245-6.

84. Bindels, R.J., et al., *Effect of protein kinase C activation and down-regulation on active calcium transport*. *Kidney Int*, 1993. **43**(2): p. 295-300.
85. Hoenderop, J.G., et al., *Hormone-stimulated Ca^{2+} reabsorption in rabbit kidney cortical collecting system is cAMP-independent and involves a phorbol ester-insensitive PKC isotype*. *Kidney Int*, 1999. **55**(1): p. 225-33.
86. Schwindinger, W.F., et al., *Coupling of the PTH/PTHrP receptor to multiple G-proteins. Direct demonstration of receptor activation of Gs, Gq/11, and Gi(1) by [α - ^{32}P]GTP-gamma-azidoanilide photoaffinity labeling*. *Endocrine*, 1998. **8**(2): p. 201-9.
87. Seldin, D.W., *Renal handling of calcium*. *Nephron*, 1999. **81 Suppl 1**: p. 2-7.
88. Liedtke, W., et al., *Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor*. *Cell*, 2000. **103**(3): p. 525-35.
89. Coady, M.J., et al., *Identification of a novel Na^{+} /myo-inositol cotransporter*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(38): p. 35219-24.
90. Nilius, B., et al., *The single pore residue Asp542 determines Ca^{2+} permeation and Mg^{2+} block of the epithelial Ca^{2+} channel*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(2): p. 1020-5.
91. Niemeyer, B.A., et al., *Competitive regulation of CaT-like-mediated Ca^{2+} entry by protein kinase C and calmodulin*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(6): p. 3600-5.
92. Lambers, T.T., et al., *Regulation of the mouse epithelial Ca^{2+} channel TRPV6 by the Ca^{2+} -sensor calmodulin*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(28): p. 28855-61.
93. Peterson, B.Z., et al., *Calmodulin is the Ca^{2+} sensor for Ca^{2+} -dependent inactivation of L-type calcium channels*. *Neuron*, 1999. **22**(3): p. 549-58.
94. Bhawe, G., et al., *cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation*. *Neuron*, 2002. **35**(4): p. 721-31.
95. Cortright, D.N. and A. Szallasi, *Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update*. *Eur J Biochem*, 2004. **271**(10): p. 1814-9.
96. Gooch, J.L., et al., *Differential expression of calcineurin A isoforms in the diabetic kidney*. *J Am Soc Nephrol*, 2004. **15**(6): p. 1421-9.
97. Birnbaumer, L., et al., *A comparison of the genes coding for canonical TRP channels and their M, V and P relatives*. *Cell Calcium*, 2003. **33**(5-6): p. 419-32.
98. Tran, N., et al., *A conserved domain in the NH2 terminus important for assembly and functional expression of pacemaker channels*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(46): p. 43588-92.
99. Li, M., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, *Specification of subunit assembly by the hydrophilic amino-terminal domain of the Shaker potassium channel*. *Science*, 1992. **257**(5074): p. 1225-30.
100. Zerangue, N., Y.N. Jan, and L.Y. Jan, *An artificial tetramerization domain restores efficient assembly of functional Shaker channels lacking T1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(7): p. 3591-5.

101. Erler, I., et al., *Ca²⁺-selective Transient Receptor Potential V Channel Architecture and Function Require a Specific Ankyrin Repeat*. J Biol Chem, 2004. **279**(33): p. 34456-63.
102. Umigai, N., et al., *Topogenesis of two transmembrane type K⁺ channels, Kir 2.1 and KcsA*. J Biol Chem, 2003. **278**(41): p. 40373-84.
103. Dzeja, P.P., R.J. Zeleznikar, and N.D. Goldberg, *Adenylate kinase: kinetic behavior in intact cells indicates it is integral to multiple cellular processes*. Mol Cell Biochem, 1998. **184**(1-2): p. 169-82.
104. Brochiero, E., et al., *Activation of an ATP-dependent K(+) conductance in Xenopus oocytes by expression of adenylate kinase cloned from renal proximal tubules*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1510**(1-2): p. 29-42.

VII.ANNEXE

Contribution de l'étudiante au projet de maîtrise :

SECTION III.1 : Les sites de phosphorylation

- Mutagenèse dirigée : création des mutations simples et multiples des sites de phosphorylation
- La synthèse d'ARN et l'injection dans les œufs
- Les enregistrements électrophysiologiques

SECTION III.2 : Les répétitions d'ankyrine

- Mutagenèse dirigée : création des sites *NheI*
- Construction des délétions d'ankyrine dans le vecteur pT7TS et pCMVTag5
- La synthèse d'ARN et l'injection dans les œufs
- Les enregistrements électrophysiologiques
- Culture cellulaire et transfection des cellules HEK
- Préparation membranaire des ovocytes et des cellules HEK et les lysats totaux des cellules HEK
- L'immunobuvardage de type «Western blot»
- Traduction *in vitro* avec le marqueur ³⁵S-méthionine

SECTION III.2.3 : Interaction protéines-protéines, le système double hybride

- Les constructions pour le double hybride et le sous-clonage dans les vecteurs pGBKT7 et pGADT7
- Mise au point la technique de double hybride
- La transformation des levures et le criblage de la librairie rénale
- Analyse des clones obtenus : extraction de l'ADN des levures
- Extraction des protéines de levures et les Western-blots

Contribution des collègues au projet:

- Dr Hélène Klein a initialement sous-cloné le canal ECaC dans le vecteur pT7TS en 1999

- Yolaine Dodier a sous-cloné le canal ECaC dans le vecteur pCMVTag5 en 2002.